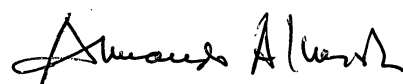


LUCIANA MUSETTI



Avaliação de efeitos de extratos de *Piper nigrum* L.
sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855
(COLEOPTERA, CURCULIONIDAE).

Tese apresentada à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
área de concentração em Entomologia,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas.

CURITIBA
1991

Índice

Introdução.....	01
Revisão Bibliográfica.....	03
Material e Métodos.....	07
1. Criação-estoque.....	07
2. Preparação dos extratos.....	08
3. Tratamento dos grãos.....	08
4. Ação tóxica e fagoinibidora.....	09
5. Efeito residual.....	10
6. Repelência.....	11
7. Ação sobre a progênie (F1) de indivíduos expostos a grãos tratados com os extratos de <i>Piper nigrum</i>	13
8. Delineamento e Análise estatística.....	14
Resultados e Discussão.....	15
1. Ação tóxica de extratos de <i>P. nigrum</i> sobre adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	15
1.1. Extratos frescos.....	15
1.2. Extratos com 1 ano de armazenamento (T=0°C).....	22
2. Efeito residual.....	27
3. Fagoinibição.....	36
4. Repelência.....	43

5. Ação sobre a progênie de indivíduos expostos a grãos tratados com os extratos de <i>P.nigrum</i>	47
6. Proteção.....	49
Conclusões.....	53
Resumo.....	55
Summary.....	57
Referências Bibliográficas.....	59
Apêndices.....	63

Agradecimentos

Ao Prof. orientador, Dr. Armando Antunes Almeida.

Ao Prof. Dr. Eduardo Augusto Moreira, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio técnico e material na preparação dos extratos.

Ao Eng. Agr. Edilson Batista de Oliveira, do CNPF/EMBRAPA, pelas sugestões na análise estatística

À Agrocere S.A., que forneceu o milho utilizado neste trabalho.

Um agradecimento especial aos meus pais e amigos, que estiveram presentes em todos os momentos, com seu conhecimento, sua experiência de vida e seu carinho.

Introdução

Nos últimos 50 anos, os inseticidas sintéticos têm sido o principal meio de controle de insetos-praga da agricultura e de produtos armazenados. No entanto, o alto custo ecológico e socio-econômico de sua utilização levou pesquisadores à reformulação do conceito de controle de insetos-praga, baseados no reconhecimento de que este não pode ser feito com a utilização de uma única "tática milagrosa", mas sim pela fusão de várias práticas fundamentadas em princípios ecológicos.

Passou-se, então, a buscar alternativas, através do desenvolvimento de novas técnicas e do resgate de métodos tradicionais de cultivo e proteção de plantas e produtos armazenados. Dentro deste contexto, insere-se a utilização de substâncias de origem vegetal para o controle destes insetos, cujas primeiras referências encontram-se no "Rig Veda", livro clássico do Hinduísmo, datado do século II antes de Cristo (Chopra et al., 1949, citado por Ahmed & Grainge, 1986).

Nos últimos anos, o interesse por substâncias de origem vegetal cresceu muito, já que são uma alternativa mais segura, mais econômica e mais facilmente biodegradável em relação à utilização de inseticidas sintéticos. Além da toxicidade, muitas espécies botânicas também apresentam efeitos biológicos diferenciados sobre um número considerável de insetos-praga, incluindo: alteração do comportamento (repelência, fagoinibição, inibição de oviposição, atração) e do desenvolvimento (modificação nos processos de crescimento e reprodução).

No caso dos grãos armazenados o interesse pelas substâncias vegetais deve-se, em grande parte, ao fato de que estas fornecem um tratamento eficaz, aliado à uma considerável redução dos problemas com resíduos tóxicos, quando comparadas aos inseticidas sintéticos.

Os frutos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) possuem vários alcalóides na sua constituição química. A ação tóxica destas substâncias, em conjunto e isoladamente, foi verificada para alguns insetos que atacam grãos armazenados. Entretanto, nenhum estudo foi feito sobre outros tipos de ação biológica que podem ser provocados pelos alcalóides, como a fagoinibição e a repelência.

Este estudo, ainda que preliminar, visa avaliar o potencial de utilização de extratos de *P. nigrum* na proteção de grãos de milho armazenado contra *Sitophilus zeamais*, através da determinação de seu efeito tóxico, fagoinibidor, repelente e de sua ação sobre a progênie (F1) de indivíduos expostos a grãos tratados com os extratos.

Revisão Bibliográfica

Vários pesquisadores estudaram a constituição química de plantas do gênero *Piper* (PIPERACEAE), tais como: Normant (1964); Chatterjee & Dutta (1966); Loder *et al.*, (1966); Takahashi *et al.*, (1969); Brewe *et al.*, (1970); Joshi *et al.*, (1975); Gupta *et al.*, (1977) e Sondengam *et al.*, (1977).

Dentre os constituintes químicos dos frutos de plantas deste gênero, em especial *Piper nigrum*, os alcalóides, mais especificamente um grupo de amidas insaturadas, parecem ser as principais substâncias produzidas pelo metabolismo secundário destas plantas (Miyakado, *et al.*, 1983). Tais substâncias possuem efeito tóxico sobre insetos e podem, algumas vezes, atuar como fagoinibidores (Chapman, 1974; Levinson, 1976).

A primeira referência ao efeito tóxico de *P. nigrum* sobre insetos foi feita por McIndoo & Sievers (1924). Entretanto, poucos estudos foram realizados no sentido de avaliar seu potencial no controle de insetos-praga. Freeborn & Wymore (1929) verificaram que a aplicação do pó de frutos secos de pimenta sobre pés de milho repeliu os adultos de *Heliothis obsoleta*(=zea). Hartzell & Wilcoxon (1941) testaram extratos aquosos e acetônicos de 150 espécies vegetais sobre diversos insetos em busca de substâncias inseticidas, e verificaram que os extratos de *P. nigrum* e *P. cubeba*, entre outros, possuíam efeito tóxico sobre larvas do mosquito *Culex fatigans* (*quinquefasciatus*, auct.). Hartzell, 1944 também testou os extratos sobre *Aphis rumicis* e *Epilachna varivestis*, mas não obteve resultado satisfatório. Outros estudos

determinaram a ação tóxica e paralizante de constituintes químicos dos frutos de *P. nigrum*, como a piperina e o "pellitorine", sobre *Musca domestica* (Harvill et al., 1943 e Sinerholm et al., 1945, citados por Miyakado et al., 1979; Jacobson, 1953).

A utilização de *P. nigrum* para o controle de insetos que atacam grãos armazenados foi inicialmente testada por Lathrop & Keirstead (1946), que obtiveram bons resultados no controle de *Acanthoscelides obtectus*, misturando o pó de frutos secos de pimenta aos grãos de feijão. A maioria destes estudos não teve continuidade e, apesar dos resultados promissores, mais de duas décadas se passaram até que novos estudos fossem realizados.

Su (1977) resgatou a utilização de *P. nigrum* para a proteção de grãos armazenados. Este autor verificou uma alta toxicidade do extrato bruto, do extrato purificado e do pó de frutos secos de pimenta sobre adultos de *Sitophilus oryzae* e *Callosobruchus maculatus*, a qual foi atribuída à ação conjunta ou sinérgica dos componentes químicos de *P. nigrum*. Posteriormente, Su (1978) determinou a existência de diferentes níveis de toxicidade entre as cultivares Malabar Indiana, Lampong Indonésia e Brasileira sobre adultos de *S. oryzae*, *C. maculatus* e *Lasioderma serricorne*.

Paralelamente, Scott & McKibben (1978) demonstraram a alta toxicidade tópica dos extratos bruto e purificado sobre adultos de *Anthonomus grandis*.

Miyakado et al. (1979), Miyakado & Yoshioka (1979) e Nakatani & Inatani (1981) isolaram e determinaram a estrutura de várias amidas alcaloidais dos frutos de *P. nigrum*, as quais apresentaram alta toxicidade para *Callosobruchus chinensis*. Num trabalho subsequente, Miyakado et al. (1980) compararam o efeito tóxico de diferentes combinações de várias amidas e do extrato

bruto de *P.nigrum*, e concluíram que o efeito inseticida do extrato bruto pode ser atribuído à ação conjunta daquelas substâncias. Luca (1982), numa revisão sobre produtos de origem vegetal como alternativa não específica para o controle de insetos-praga de grãos armazenados, referiu-se aos frutos de *P.nigrum* como "eficientes repelentes". Su (1984a) comparou o efeito tóxico do extrato e do pó de frutos secos de *P.nigrum* sobre adultos de *S.oryzae* e verificou que a mortalidade provocada pelo pó foi baixa, comparada com aquela provocada pelo extrato. O autor atribuiu esta diferença ao fato de que o pó não aderiu aos grãos e se acumulou no fundo dos recipientes, limitando o contato dos insetos com aquele material. Neste mesmo trabalho, a proteção obtida para grãos de trigo tratados com extrato acetônico, através da redução da F1, foi superior a 95% por um período de até 6 meses. Su (1984b) verificou que o extrato de frutos secos de *P.nigrum* foi mais tóxico para *S.oryzae*, *C.maculatus*, *L.serricornis* e *Tribolium confusum* que o de frutos verdes, embora ambos os extratos tenham oferecido boa proteção contra *C.maculatus* e *S.oryzae*. Singh & Krishna (1980) observaram que fêmeas de *Tribolium confusum* alimentadas com uma mistura de levedura e pimenta em pó, morreram num período inferior a 20 dias e não chegaram a ovipositar. Sighamony et al.(1986), comparou a eficiência do extrato acetônico bruto de *P.nigrum* e de diversos óleos essenciais de plantas nativas da Índia na proteção de grãos de trigo contra *S.oryzae* e *Rhyzopertha dominica*, e constataram que a persistência do efeito protetor de *P.nigrum* foi superior a 60 dias, ultrapassando todos os outros tratamentos. Javier & Morallo-Rejesus (1986) avaliaram a toxicidade de extratos e do pó de *P.nigrum* para uma série de espécies de insetos, entre elas *S.zeamais*. O resultado por eles obtido no controle deste inseto

foi altamente satisfatório, em comparação com o inseticida fosforado Malation; a toxicidade residual dos extratos de *F.nigrum* foi de 2 meses. Os autores ainda observaram uma significativa redução da F1 em grãos tratados com extrato. Este fato foi atribuído à ação do extrato sobre as formas imaturas, entretanto, esta ação não foi avaliada no referido trabalho.

Material e Métodos

1. Criação-estoque

A criação-estoque, mantida em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} = 75 \pm 10\%$), foi iniciada a partir de adultos de *Sitophilus zeamais* obtidos em amostras de milho infestado existentes no Departamento de Zoologia-UFRJ e em outras trazidas do município de São José dos Pinhais-PR.

O milho utilizado para a criação-estoque foi mantido à temperatura de -10°C por 96h, de modo a eliminar qualquer tipo de infestação. Posteriormente, o milho foi deixado em repouso por 48h para o restabelecimento do seu equilíbrio higroscópico.

Os adultos de *S. zeamais* foram colocados em frascos de vidro (8 x 16cm) contendo grãos de milho até 2/3 de sua altura e fechados com tampa de metal perfurada e resvestida com tela de metal (# 45).

Todos os frascos foram mantidos sobre bases de madeira colocadas dentro de bandejas com óleo vegetal, de modo a evitar a infestação por outros insetos e ácaros (Miller et al., 1969). A remoção destes insetos foi feita 7 a 10 dias após a infestação. Os adultos emergidos nestes frascos foram utilizados para a realização de ensaios e para a infestação de novas quantidades de milho para a manutenção da criação-estoque.

Periodicamente, adultos obtidos de material infestado proveniente do município de Concórdia-SC foram acrescentados à criação-estoque.

2. Preparação dos extratos

Para estudar os efeitos dos extratos de *Piper nigrum* sobre *Sitophilus zeamais* foram preparados 2 extratos brutos, um utilizando acetona e outro utilizando metanol como solvente. Os extratos foram obtidos a partir de sementes secas de *P. nigrum*, adquiridas no comércio local e moídas em moinho caseiro até a condição de pó fino. 100g deste pó foram colocados em extrator de Soxlet, junto com o solvente acetona; o mesmo foi feito para o solvente metanol. Estes materiais foram deixados em refluxo até que os solventes não apresentassem qualquer colorido ($\pm 48h$). Durante o processo de extração, a fonte de calor dos extratores foi ligada às 8:00 e desligada às 17:00h. As soluções resultantes deste processo foram reduzidas ao volume de 100ml. Estas soluções, aqui denominadas de soluções-estoque e consideradas como concentração 100% de cada extrato, tendo sido colocadas em balões volumétricos fechados por tampa de vidro e mantidas em congelador à temperatura de 0°C. A diluição das soluções-estoque (100%), para a obtenção das diversas concentrações testadas nos ensaios, foi sempre realizada pouco antes da sua utilização.

3. Tratamento dos grãos

O milho utilizado nos ensaios (Agrocere, cultivar AG64-A) foi mantido à temperatura de -10°C durante 96h, para a eliminação de qualquer tipo de infestação. Posteriormente, este

milho foi deixado em repouso por 48h para o restabelecimento do seu equilíbrio higroscópico.

Os tratamentos foram constituídos por diferentes concentrações de cada extrato de *P. nigrum*, obtidas através de diluições sucessivas da solução-estoque (100g/100ml), considerada como 100%. A proporção de solução aplicada nos grãos foi de 1ml para cada 40g, quantidade suficiente para cobrir a superfície dos grãos sem acumular no fundo do frasco. Para cada tratamento, os grãos foram colocados em frasco de vidro (8 x 16cm) e a solução derramada pelas paredes do frasco com auxílio de uma pipeta de vidro graduada. O frasco foi fechado com tampa plástica e agitado manualmente durante 4 minutos.

A secagem dos grãos tratados foi feita ao ar, sobre superfície revestida com plástico, durante um período de 3-4h.

A aplicação dos extratos sobre os grãos de milho foi padronizada em todos os ensaios.

4. Ação tóxica e fagoinibidora

Para estudar o efeito tóxico dos extratos acetônico e metanólico de *P. nigrum* sobre adultos de *S. zeamais*, foram testadas 6 concentrações (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625%) de cada extrato, cada uma constituindo um tratamento.

Foram feitas 4 repetições por tratamento. Em cada repetição, 15 insetos (0-72h de idade) foram colocados em frasco de acrílico contendo 30g de grãos tratados. Todos os grãos de milho utilizados foram selecionados sob lupa, de modo a eliminar aqueles danificados. A infestação foi realizada logo após a

secagem dos grãos.

A contagem e sexagem dos insetos mortos foi realizada diariamente, durante 28 dias. Foram considerados mortos os insetos que, quando tocados com pincel, não apresentavam qualquer movimento.

Neste ensaio foi, também, determinado o número de grãos furados, bem como o tipo e distribuição das perfurações feitas pelos insetos, 2 e 4 dias após a infestação, com o objetivo de avaliar a ação fagoinibidora dos extratos de *P.nigrum* sobre adultos de *S.zeamais*.

Para avaliar a persistência do efeito tóxico de extratos de *P.nigrum* conservados em congelador ($T = 0^{\circ}\text{C}$), este mesmo ensaio foi realizado com extratos que permaneceram armazenados nesta condição durante um período de 12 meses.

5. Efeito residual

Para estudar o efeito residual dos extratos acetônico e metanólico de *P.nigrum* sobre adultos de *S.zeamais*, foram testadas as 2 concentrações mais elevadas (50 e 25%) de cada extrato, cada uma constituindo um tratamento.

Foram realizados ensaios biológicos com grãos tratados 90, 60, 30 e 15 dias antes da data de infestação. Os grãos foram tratados 90 dias antes da data determinada para a infestação e, após a secagem, colocados em frascos de vidro (8 x 16cm) com tampa perfurada; os frascos foram etiquetados e mantidos em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} = 75 \pm 10\%$). Este procedimento foi repetido aos 60, 30 e 15 dias antes da data determinada para a

infestação. Todos os ensaios foram infestados no mesmo dia.

Foram feitas 6 repetições por tratamento e, em cada repetição, 15 insetos (0-72 horas de idade) foram colocados em frascos de acrílico contendo 30 gramas de grãos tratados. As testemunhas foram feitas com milho tratado com acetona, com metanol e milho não tratado.

6. Repelência

Para o estudo do efeito repelente do extrato de *Piper nigrum* sobre adultos de *Sitophilus zeamais*, foram realizados 2 ensaios, nos quais utilizou-se, apenas, o extrato acetônico.

Primeiramente, apenas a dosagem de 50% foi comparada com a testemunha com solvente. Foram utilizadas caixas plásticas retangulares (4,5 x 12 x 20cm), divididas em 3 compartimentos por tiras de papelão (FIGURA 1). Os compartimentos laterais foram preenchidos, de um lado com grãos tratados com extrato e do outro com grãos tratados com solvente. No compartimento central de cada caixa foram liberados 75 insetos e, em seguida, as caixas foram fechadas com tampas teladas e mantidas em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} = 75 \pm 10\%$) por 24 horas. Cada caixa foi considerada uma repetição, num total de 8 repetições.

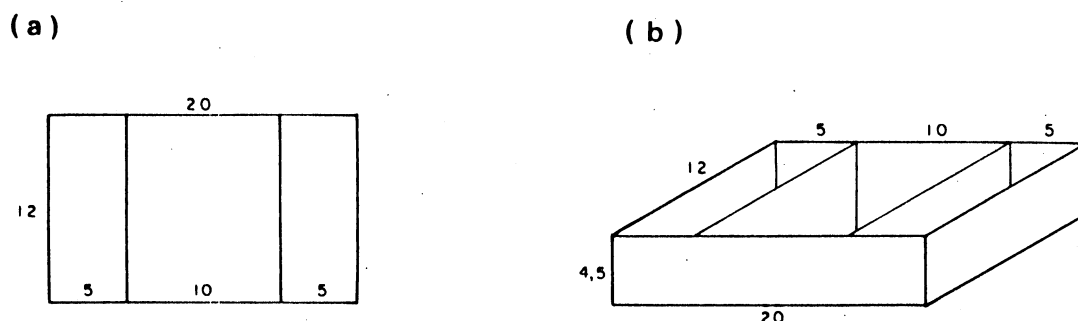


FIGURA 1. Caixa plástica utilizada no ensaio de dupla escolha.

(a) vista superior (b) perspectiva

Paralelamente, foi realizado ensaio semelhante com grãos tratados com a dosagem de 50% do extrato acetônico, os quais permaneceram armazenados durante 11 meses em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^\circ\text{C}$ e $\text{UR} = 75 \pm 10\%$). Em cada repetição foram liberados 88 insetos, num total de 8 repetições.

A avaliação foi feita pela contagem dos indivíduos presentes em cada compartimento.

Posteriormente, foi realizado ensaio de múltipla escolha, no qual foram comparadas as dosagens de 6,25, 12,5 e 25%, em conjunto com a testemunha com solvente. Para tanto, foram utilizadas caixas plásticas (38 x 10cm) no interior das quais foi adaptada uma placa de isopor com 8 orifícios igualmente espaçados entre si e da parede da caixa (FIGURA 2). Nestes orifícios foram colocados copos plásticos, com capacidade para 20 gramas de grãos. Dois a dois, os copos foram completamente preenchidos com os grãos tratados com acetona e com cada uma das 3 dosagens testadas. Os

copos contendo o mesmo tratamento foram colocados em posições opostas dentro da caixa. 65 insetos foram liberados no centro de cada caixa, que foram fechadas com tampas teladas e mantidas em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $UR = 75 \pm 10\%$) por 24 horas. Cada caixa foi considerada uma repetição, num total de 16 repetições.

A avaliação foi feita pela contagem dos indivíduos presentes em cada tratamento, a fim de determinar sua distribuição.

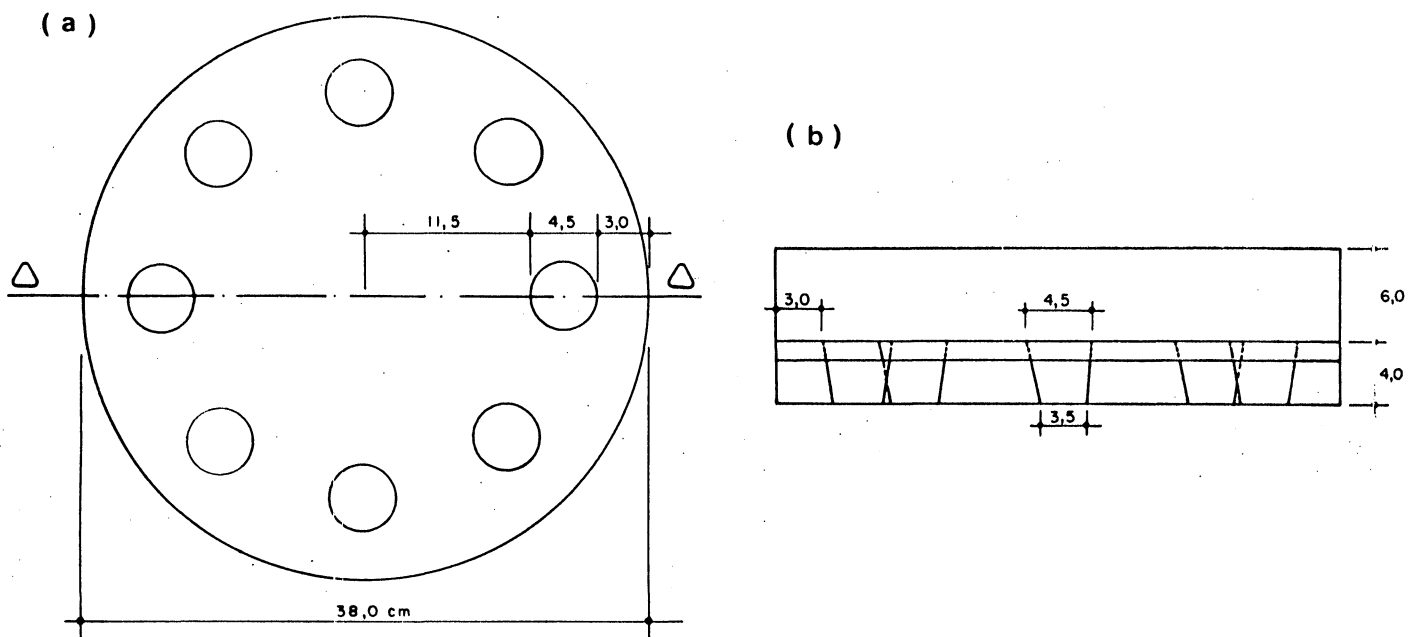


FIGURA 2. Caixa plástica utilizada no ensaio de múltipla escolha.

(a) vista superior (b) corte

7. Ação sobre a progênie (F1) de indivíduos expostos a grãos tratados com os extratos de *P. nigrum*.

Para estudar o efeito dos extratos acetônico e metanólico de *P. nigrum* sobre o número de indivíduos produzidos na geração F1, foram testadas 6 concentrações (50, 25, 12.5, 6.25,

3.125 e 1.5625%) de cada extrato, cada uma constituindo um tratamento. Para cada tratamento foram feitas 9 repetições. Em cada repetição, 5 casais de *S. zeamais* (0-72 horas de idade) foram colocados em frascos de acrílico (4 x 7cm) contendo 30g de grãos tratados. Foram feitas testemunhas com milho tratado com acetona, milho tratado com metanol e milho sem tratamento. Os frascos foram mantidos em sala climatizada ($T = 26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $UR = 75 \pm 10\%$) durante todo o período de duração de ensaio.

A mortalidade foi registrada a cada 7 dias até o 28º dia após a infestação, quando os adultos restantes foram removidos e descartados. A partir daí, os frascos foram examinados diariamente para verificar o início da emergência dos adultos da geração F1. Após a emergência do 1º adulto, e nos 60 dias consecutivos, todos os indivíduos foram contados e removidos.

8. Delineamento e Análise estatística

O delineamento utilizado em todos os ensaios foi o inteiramente ao acaso.

O teste t foi utilizado para a verificação da significância dos resultados obtidos com o extrato acetônico e com o extrato metanólico. Os níveis quantitativos (dosagens, dias) tiveram seus efeitos estudados por curvas de regressão.

Resultados e Discussão

1. Ação tóxica de extratos de *Piper nigrum* sobre adultos de *Sitophilus zeamais*.

1.1. Extrato fresco

Os resultados referentes à ação tóxica dos extratos frescos de *P. nigrum* sobre adultos de *S. zeamais*, encontram-se nas TABELAS 1, 2 e 3; FIGURAS 3, 4 e 5 ; APÊNDICES I e II.

TABELA 1. Mortalidade total¹ (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos, por 28 dias, a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

Concentração (%)								
Extrato	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50	Média ²
ACET.	0	5,26	26,3	33,3	82,4	80,7	98,2	46,59a
MET.	0	0	1,7	30,5	57,6	86,4	91,4	38,22b

1. corrigida pela fórmula de Abbott.

2. médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste t.

Analisando-se os resultados apresentados na TABELA 1, constata-se que, em média, o extrato acetônico foi significativamente ($t; P(0,05)$) mais tóxico que o extrato metanólico. Na FIGURA 3, onde estão representadas as equações de regressão da mortalidade total em função das concentrações dos extratos, esta diferença fica evidenciada.

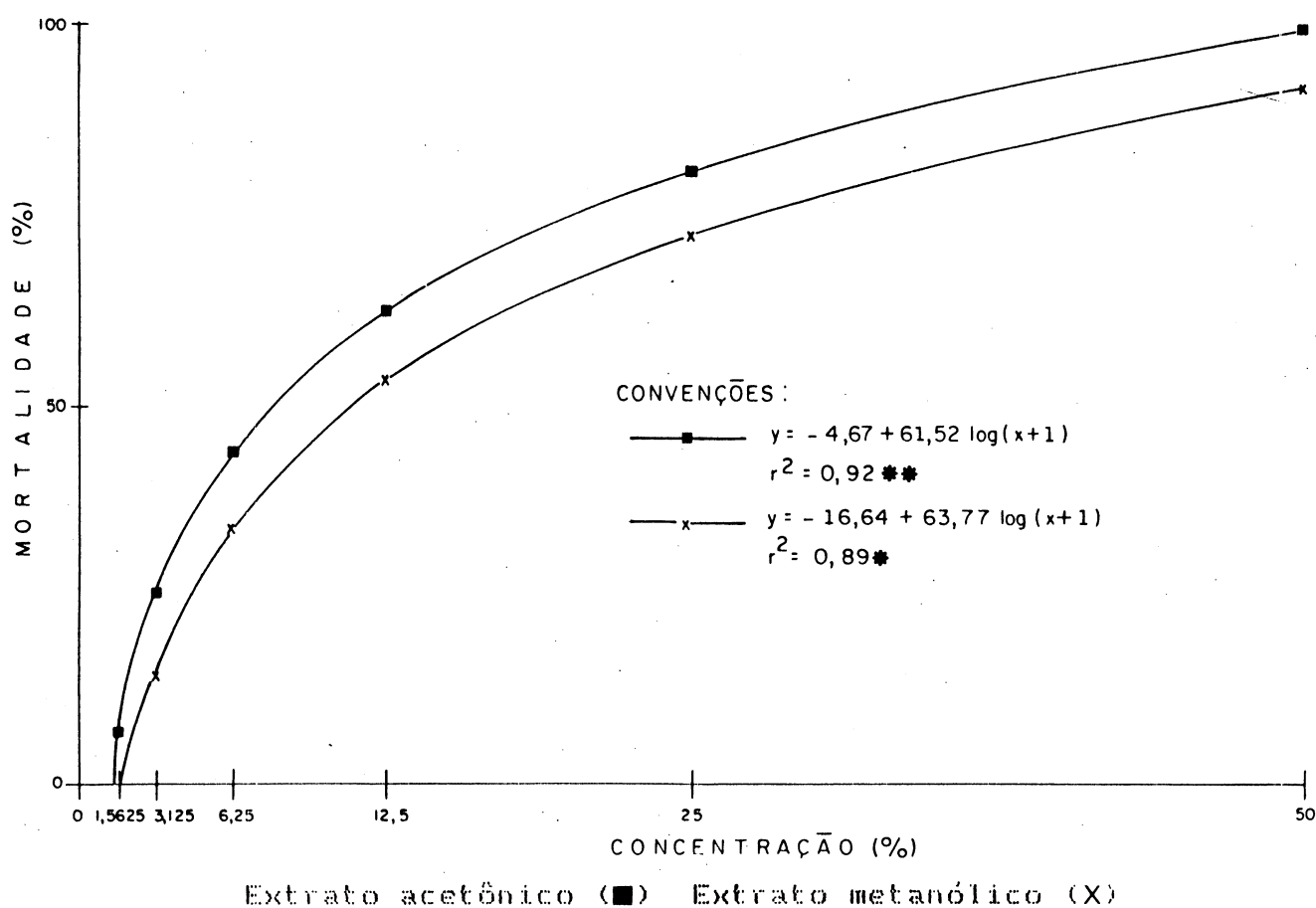


FIGURA 3. Mortalidade total¹ (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* em função da concentração dos extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

1. corrigida pela fórmula de Abbott

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Continuando a análise da TABELA 1, verifica-se que mesmo após 28 dias a mortalidade obtida com a concentração máxima (50%) não atingiu 100%. Este resultado foi bastante inferior ao de Javier & Morallo-Rejesus (1986), que obtiveram 100% de mortalidade para adultos de *S. zeamais* em milho tratado com 500ppm de extrato (equivalente a 5%), logo aos dois dias de avaliação.

A disparidade entre estes resultados pode ser devida, entre outros fatores, à diferença de toxicidade do material vegetal utilizado e ao método de extração empregado. Com relação ao material vegetal, Su (1978) verificou que diferentes variedades de *P. nigrum* apresentaram toxicidade diferente para uma mesma espécie de inseto e atribuiu esta diferença a variações na proporção de seus constituintes químicos. Além da variedade, a forma de cultivo, a fertilidade do solo e o clima do local de origem podem influenciar grandemente a constituição química do material vegetal.

Quanto ao tipo de extração, a comparação da metodologia utilizada por Javier & Morallo-Rejesus (1986) e a utilizada no presente trabalho, sugere que aquela deve ter sido mais eficiente, em especial pela exposição do material vegetal a diversos solventes.

De acordo com as TABELAS 2 e 3, verifica-se que em todas as concentrações de ambos os extratos, a mortalidade só começou a ocorrer 2 dias após a infestação, aumentando juntamente com o tempo de exposição dos insetos aos extratos. Nas concentrações mais elevadas (50, 25 e 12,5%), a maior parcela da mortalidade observada ocorreu até o 10º dia.

Su (1977 e 1978) já havia verificado efeito semelhante para adultos de *S.oryzae* mantidos em grãos de trigo tratados com extratos de *P.nigrum*.

TABELA 2. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum*.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	8.3	23.3
6	0	3.3	3.3	0	13.3	40.0	63.3
8	0	3.3	8.3	6.7	36.7	50.0	75.0
10	0	3.3	13.3	8.3	46.7	70.0	95.0
12	0	8.3	21.6	8.3	56.7	71.6	96.7
14	0	8.3	23.3	8.3	58.3	73.3	96.7
16	0	10.0	23.3	8.3	60.0	75.0	96.7
18	0	10.0	23.3	13.3	66.7	75.0	96.7
20	0	10.0	23.3	16.7	68.3	76.7	96.7
22	0	10.0	23.3	23.3	71.7	80.0	96.7
24	0	10.0	28.3	25.0	76.7	81.7	96.7
26	0	10.0	28.3	31.7	80.0	81.7	98.3
28	5.0	10.0	30.0	36.7	83.3	81.7	98.3

TABELA 3. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum*.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1.7	3.3	0	5.0
6	1.7	1.7	0	3.3	10.0	23.3	46.7
8	1.7	1.7	0	10.0	18.3	53.3	68.3
10	1.7	1.7	0	13.3	25.0	58.3	78.3
12	1.7	1.7	0	13.3	25.0	58.3	85.0
14	1.7	1.7	1.7	21.7	28.3	60.0	86.7
16	1.7	1.7	1.7	21.7	31.7	60.0	86.7
18	1.7	1.7	1.7	21.7	33.3	65.0	86.7
20	1.7	1.7	1.7	21.7	36.7	68.3	87.7
22	1.7	1.7	1.7	23.3	36.7	75.0	86.7
24	1.7	1.7	1.7	23.3	45.0	80.0	86.7
26	1.7	1.7	1.7	26.7	53.3	83.3	90.0
28	1.7	1.7	3.3	31.7	58.3	86.7	91.7

Por outro lado, verifica-se, que a mortalidade acumulada até o 10º dia de avaliação foi significativamente maior ($t; P < 0,05$) nos tratamentos com extrato acetônico que nos com extrato metanólico. Comparando-se a mortalidade acumulada até o 10º dia em grãos tratados com a concentração de 50%, verifica-se que o extrato acetônico provocou 95% de mortalidade, contra 78,3%

provocados pelo extrato metanólico. Isto também foi observado nas demais concentrações, à exceção de 6,25%, na qual o extrato metanólico provocou maior mortalidade que o acetônico, num mesmo período de tempo.

Este resultado indica que o tempo de exposição necessário para que ocorresse mortalidade foi menor para o extrato acetônico.

As equações de regressão da mortalidade em função do tempo de exposição de *Sitophilus zeamais* aos grãos tratados estão representadas graficamente nas FIGURAS 4 e 5.

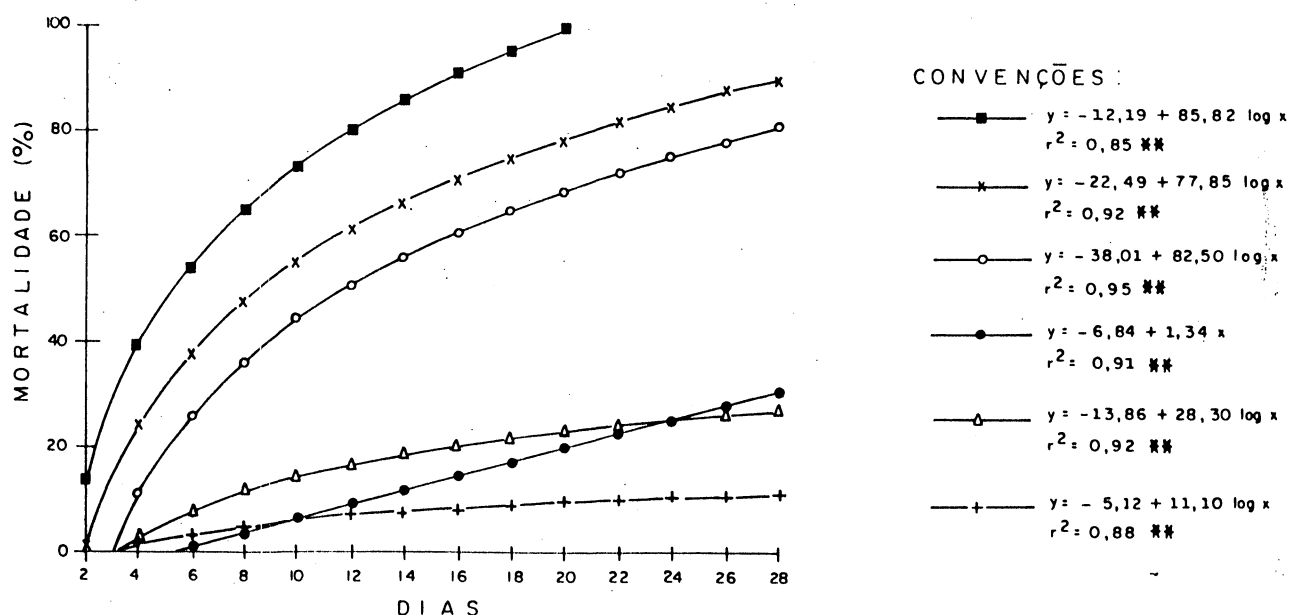


FIGURA 4. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados com o extrato acetônico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

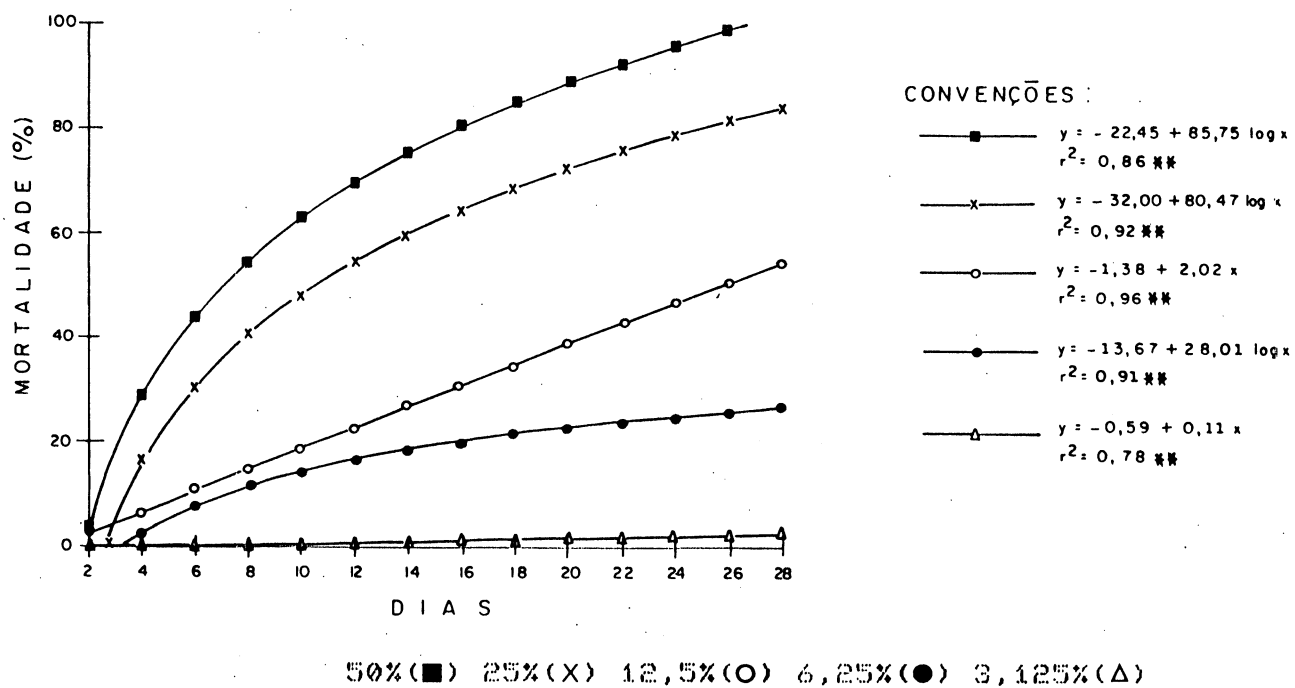


FIGURA 5. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados com o extrato metanólico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

1.2. Extratos com 1 ano de armazenamento ($T=0^{\circ}\text{C}$).

Os resultados do ensaio de mortalidade com grãos tratados com os extratos armazenados ($T=0^{\circ}\text{C}$) durante 1 ano estão apresentados nas TABELAS 4, 5 e 6; FIGURAS 6, 7 e 8 APÊNDICES III e IV.

TABELA 4. Mortalidade total(%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos, por 28 dias, a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum* armazenados por 1 ano ($T=0^{\circ}\text{C}$).

Concentração (%)								
Extrato	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50	Média ¹
ACET.	0	11,7	15,0	45,0	48,3	88,3	100	44,04a
MET.	0	1,7	3,3	11,7	55,0	90,0	88,3	35,71b

1. médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste t.

Observa-se que, em média, o extrato acetônico foi significativamente ($t; P<0,05$) mais tóxico que o extrato metanólico. As equações de regressão entre a mortalidade total e as concentrações dos extratos de *P. nigrum* que foram armazenados por 1 ano ($T=0^{\circ}\text{C}$), que estão representadas na FIGURA 6, evidenciam a maior toxicidade do extrato acetônico em relação ao metanólico.

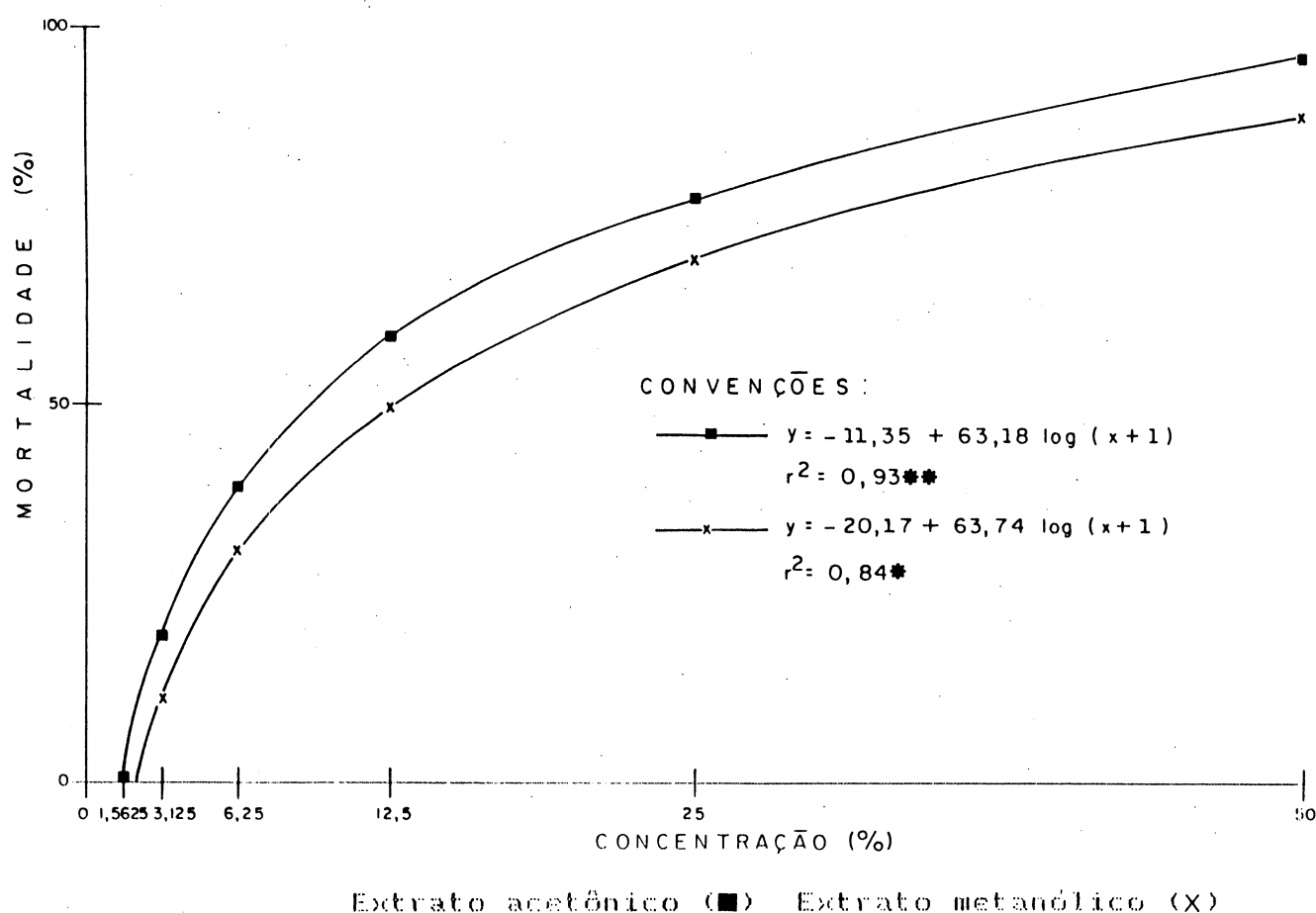


FIGURA 6. Mortalidade total(%) de adultos de *Sitophilus zeamais* em função da concentração dos extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Comparando-se os dados de mortalidade acumulada até o 10º dia de avaliação para extratos frescos (TABELAS 2 e 3) e para os extratos com 1 ano (TABELAS 5 e 6), constata-se que, nas concentrações mais elevadas, ocorreu uma diminuição significativa na toxicidade dos extratos que ficaram armazenados, embora a

mortalidade total, após 28 dias, não tenha apresentado variação considerável.

TABELA 5. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* armazenado por 1 ano (T=0°C).

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1.7	8.3
6	0	0	1.7	0	5.0	10.0	35.0
8	0	0	1.7	0	8.3	15.0	65.0
10	0	0	1.7	0	10.0	21.7	71.7
12	0	0	1.7	1.7	15.0	40.0	76.7
14	0	0	1.7	1.7	25.0	51.7	85.0
16	0	0	1.7	1.7	33.3	61.7	88.3
18	0	1.7	1.7	1.7	38.3	68.3	91.7
20	0	1.7	3.3	3.3	45.0	78.3	91.7
22	0	1.7	3.3	8.3	50.0	83.3	96.7
24	0	1.7	3.3	10.0	53.3	85.0	96.7
26	0	1.7	3.3	10.0	53.3	86.7	100.0
28	0	1.7	3.3	11.7	55.0	90.0	100.0

TABELA 6. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum* armazenado por 1 ano (T=0°C).

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1.7	0	3.3	3.3	0	0
6	0	3.3	0	6.7	15.0	18.3	16.7
8	0	8.3	13.3	10.0	23.3	31.7	45.0
10	0	11.7	13.3	13.3	23.3	41.6	51.6
12	0	11.7	13.3	15.0	25.0	48.7	55.0
14	0	11.7	13.3	20.0	25.0	56.7	66.7
16	0	11.7	13.3	23.3	28.3	65.0	70.0
18	0	11.7	15.0	30.0	31.7	71.7	73.3
20	0	11.7	15.0	35.0	33.3	81.7	73.3
22	0	11.7	15.0	40.0	36.7	83.3	75.0
24	0	11.7	15.0	40.0	41.6	85.0	80.0
26	0	11.7	15.0	40.0	46.7	86.7	81.7
28	0	11.7	15.0	45.0	48.3	88.3	88.3

As equações de regressão da mortalidade em função do tempo de exposição de *Sitophilus zeamais* aos grãos tratados estão representadas graficamente nas FIGURAS 7 e 8.

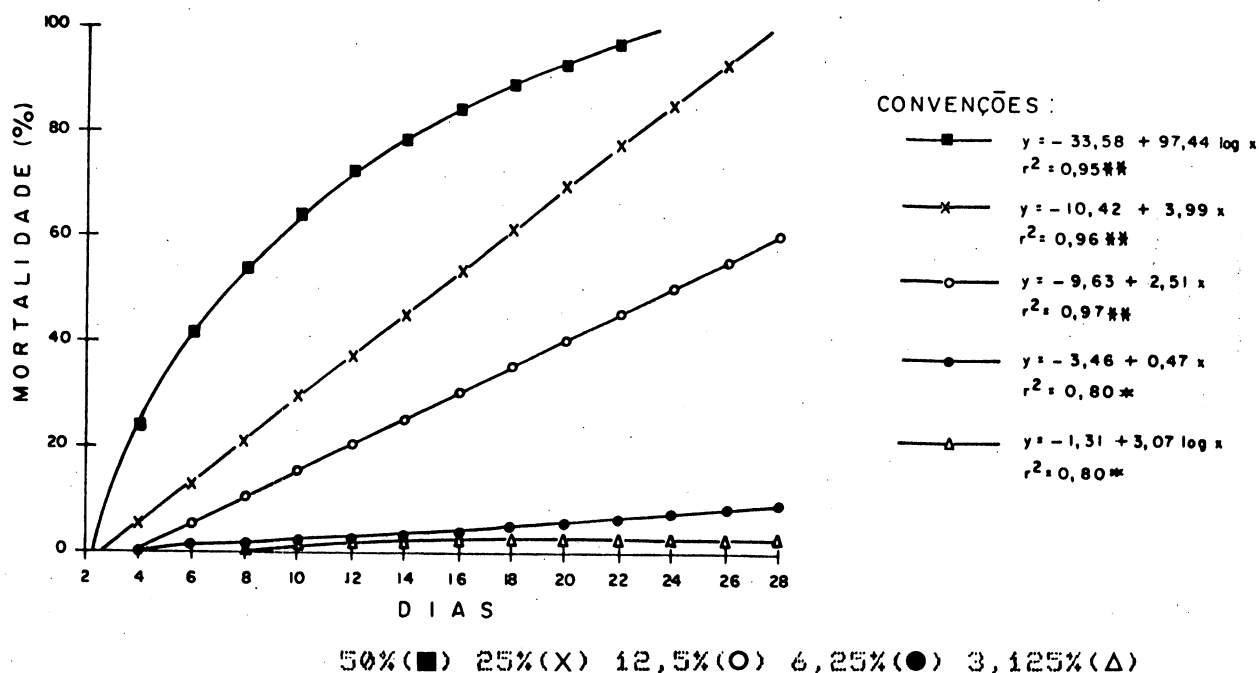


FIGURA 7. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados com o extrato acetônico de *Piper nigrum* armazenado por 1 ano (T 0°C).

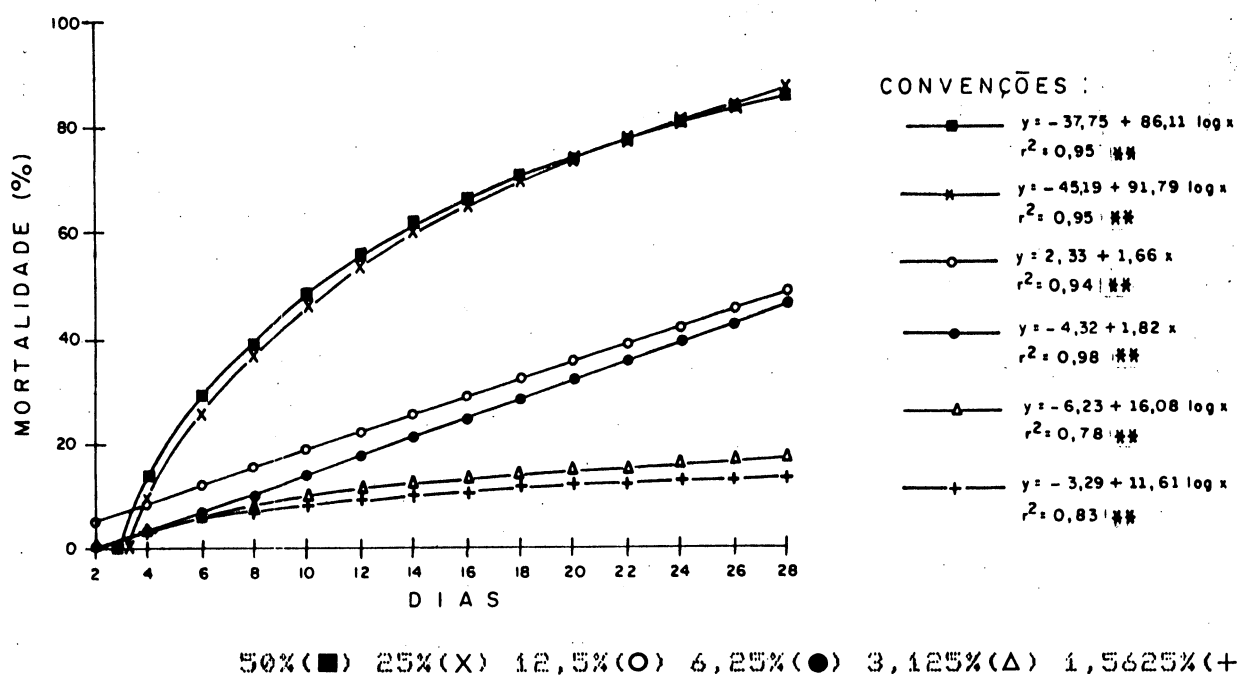


FIGURA 8. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados com o extrato metanólico de *Piper nigrum* armazenado (T= 0°C) por 1 ano.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

2. Efeito residual

Os resultados do efeito residual dos extratos de *P. nigrum* sobre adultos de *S. zeamais* encontram-se nas TABELAS 7 a 11; FIGURAS 9 a 13 e APÊNDICES V, VI, VII e VIII.

TABELA 7. Mortalidade total(%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Fiper nigrum* e infestados até 90 dias após o tratamento.

Dias após tratamento	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
01	80,6	86,5	98,2	91,5
15	92,2	87,8	97,8	91,1
30	84,4	93,3	98,9	94,4
60	83,3	87,8	96,7	95,5
90	82,2	73,3	95,5	91,1

1. corrigida pela fórmula de Abbott.

Analisando a TABELA 7, verifica-se que a mortalidade observada em grãos infestados de 0 até 90 dias após o tratamento, manteve-se praticamente a mesma nas concentrações de 25 e 50% do extrato acetônico e 50% do extrato metanólico, enquanto em 25% deste mesmo extrato, a mortalidade se manteve apenas para grãos infestados até 60 dias após o tratamento, apresentando uma queda

significativa aos 90 dias após o tratamento.

A FIGURA 9, onde estão representadas as equações de regressão da mortalidade em função do tempo de tratamento dos grãos para as duas concentrações (50 e 25%) dos extratos, evidencia a maior persistência do efeito tóxico do extrato acetônico em relação ao metanólico, no período de 90 dias.

A equação de regressão da concentração 25% do extrato metanólico foi calculada excluindo-se o valor da mortalidade em grãos infestados 30 dias após o tratamento.

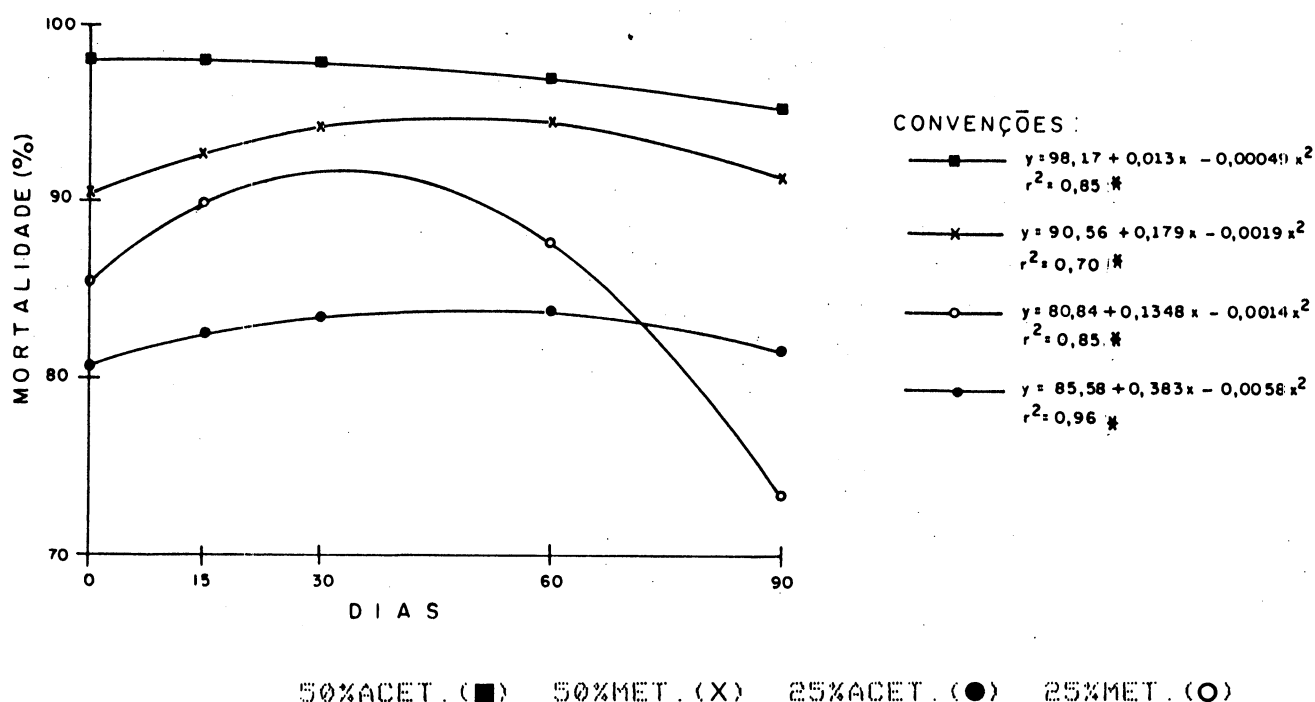


FIGURA 9. Mortalidade total (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de tratamento dos grãos.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Em todos os ensaios de efeito residual, observa-se que a mortalidade cresceu com o aumento do tempo de exposição aos grãos tratados. Este crescimento foi muito acentuado nos 10 primeiros dias de avaliação, em todos os tratamentos (TABELAS 8, 9, 10 e 11), seguindo o padrão de mortalidade observado no ensaio tóxico

com grãos tratados e infestados no mesmo dia (TABELAS 2 e 3).

TABELA 8. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*, infestados 15 dias após o tratamento.

Dias após tratamento	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
2	0	0	0	2.2
4	8.9	7.8	12.2	14.4
6	45.6	28.9	65.6	42.2
8	64.4	57.8	83.3	67.8
10	77.8	68.9	96.7	81.1
12	84.4	76.7	96.7	87.8
14	86.7	81.1	96.7	91.0
16	86.7	82.2	96.7	91.1
18	86.7	83.3	97.8	92.2
20	87.8	86.7	97.8	93.3
22	88.9	90.0	97.8	93.3
24	91.1	90.0	97.8	93.3
26	92.2	90.0	97.8	93.3
28	92.2	93.3	97.8	94.4

TABELA 9. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum* infestados 30 dias após o tratamento.

Dias após tratamento	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
2	0	0	0	0
4	4.4	3.3	17.8	10.0
6	38.9	18.9	66.7	42.2
8	55.6	51.1	87.8	71.1
10	66.7	56.7	92.2	74.4
12	67.8	61.1	93.3	75.6
14	68.9	63.3	95.6	76.7
16	68.9	66.7	95.6	78.9
18	73.3	68.9	97.8	80.0
20	76.7	71.1	98.9	80.0
22	78.9	76.7	98.9	84.4
24	83.3	84.4	98.9	87.8
26	83.3	85.6	98.9	90.0
28	84.4	87.8	98.9	91.1

TABELA 10. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET) e metanólico (MET) de *Piper nigrum*, infestados 60 dias após o tratamento.

Dias após tratamento	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET	MET	ACET	MET
2	0	0	0	0
4	1.1	7.8	8.9	4.4
6	16.7	24.4	25.6	43.3
8	35.6	44.4	51.1	65.6
10	48.9	50.0	66.7	83.3
12	58.9	53.3	75.6	84.4
14	61.1	57.8	77.8	84.4
16	61.1	58.9	78.9	84.4
18	67.8	63.3	82.2	84.4
20	71.1	66.7	84.4	85.6
22	77.8	74.4	93.3	90.0
24	80.0	80.0	95.6	93.3
26	81.1	81.1	95.6	94.4
28	83.3	87.8	96.7	95.6

TABELA 11. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extratos acetônico (ACET) e metanólico (MET) de *Piper nigrum*, infestados 90 dias após o tratamento.

Dias após tratamento	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
2	1.1	0	0	0
4	3.3	3.3	8.8	5.6
6	21.1	33.3	44.4	37.8
8	35.6	53.3	70.0	61.1
10	47.8	57.8	78.9	70.0
12	47.8	60.0	81.1	74.4
14	52.2	62.2	83.3	74.4
16	58.9	64.4	85.6	76.7
18	64.4	66.7	86.7	77.8
20	67.8	66.7	86.7	80.0
22	70.0	70.0	90.0	88.9
24	74.4	70.0	92.2	91.1
26	77.8	71.1	93.3	91.1
28	82.2	73.3	95.6	91.1

As equações de regressão da mortalidade em função do tempo de exposição dos adultos de *Sitophilus zeamais* a grãos de milho tratados 15, 30, 60 e 90 dias antes da infestação para os extratos acetônico e metanólico de *P. nigrum* estão representadas nas FIGURAS 10 a 13).

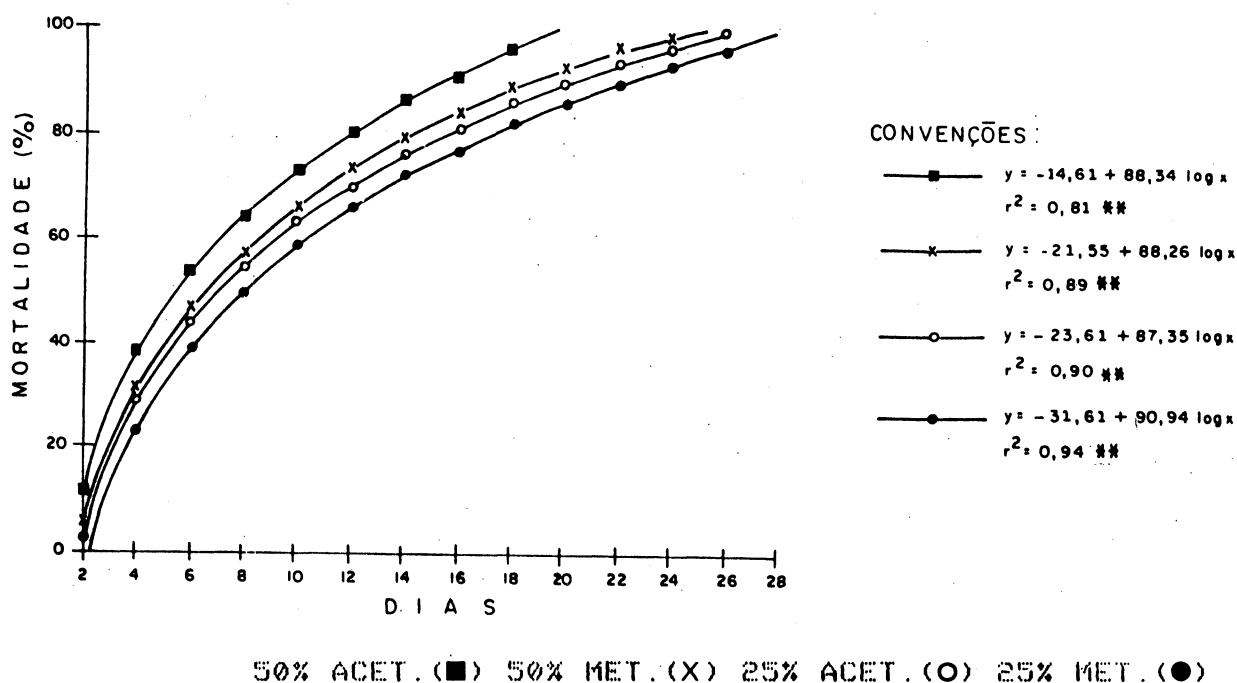


FIGURA 10. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados, 15 dias antes da infestação, com os extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

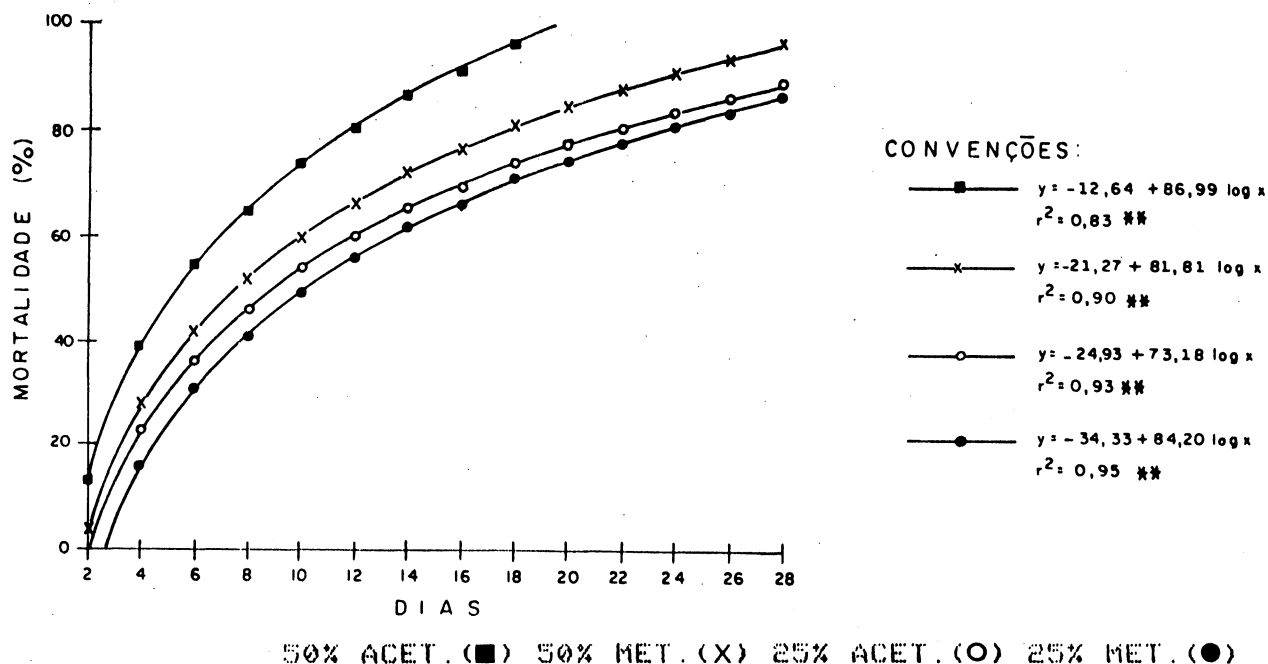


FIGURA 11. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados, 30 dias antes da infestação, com os extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

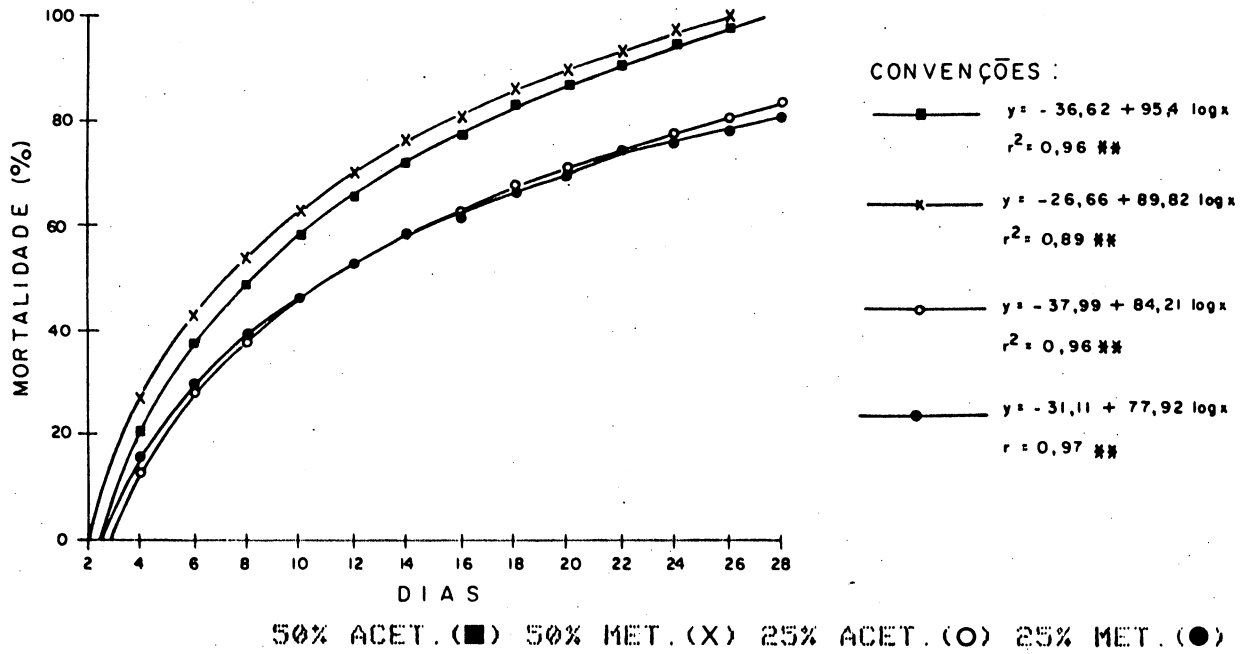


FIGURA 12. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados, 60 dias antes da infestação, com extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

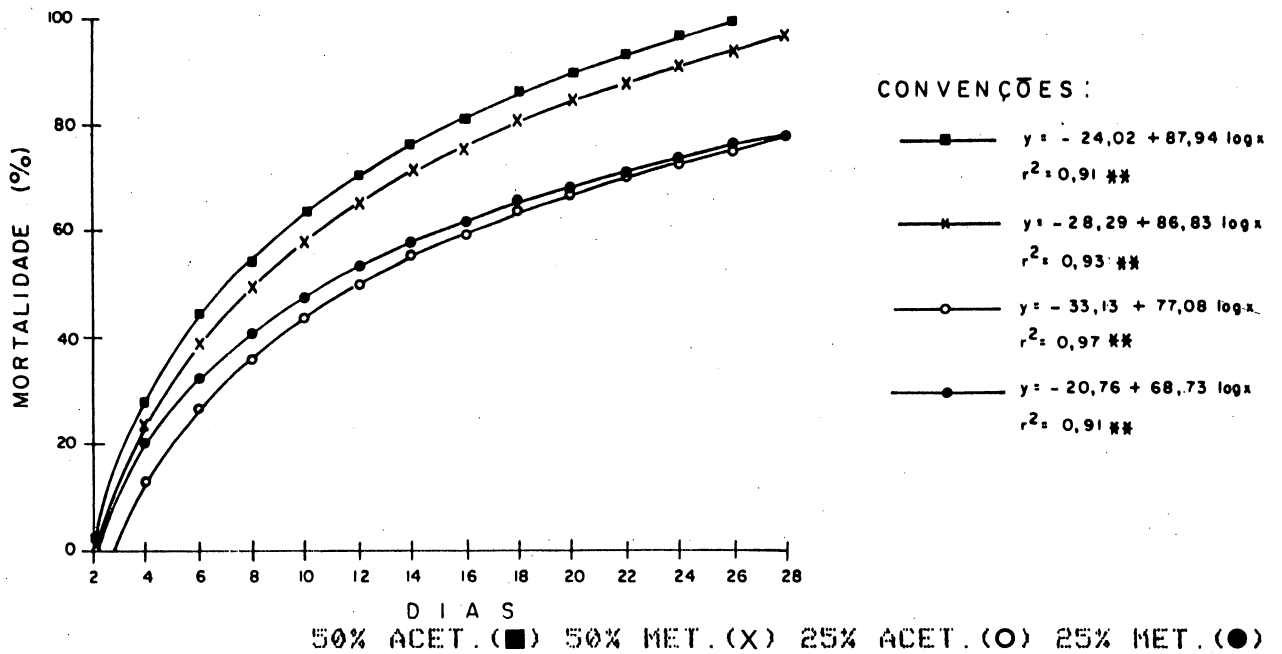


FIGURA 13. Mortalidade de adultos de *Sitophilus zeamais* em função do tempo de exposição a grãos de milho tratados, 90 dias antes da infestação, com os extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Comparando-se, agora, a mortalidade observada em grãos tratados com 50% do extrato acetônico nos ensaios de efeito residual, nota-se que nos grãos infestados 15 e 30 dias após o tratamento, a mortalidade acumulada no 10º dia de avaliação foi superior a 90%, enquanto em grãos infestados 60 e 90 dias após o tratamento esta mortalidade só foi alcançada após o 20º dia de avaliação. O mesmo pode ser aplicado para as demais concentrações.

De acordo com estes resultados, ocorreu uma redução na eficiência do extrato com o aumento do tempo entre o tratamento e infestação, embora a mortalidade total não tenha apresentado diferença significativa para grãos infestados entre 0 e 90 dias.

3. Fagoinibição

Os resultados da ação fagoinibidora dos extratos de *F.nigrum* sobre *S.zeamais* encontram-se nas TABELAS 12 e 13; FIGURAS 14 a 17 e APÊNDICES IX e X.

TABELA 12. Quantidade de grãos perfurados (%) encontrados 2 e 4 dias após a infestação com *Sitophilus zeamais*.

Concen- tração	2 dias após a infestação		4 dias após a infestação	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
0	6,20	6,20	12,30	12,30
1,5625	3,50	2,50	5,50	5,50
3,125	2,00	2,25	4,25	4,25
6,25	2,25	3,25	4,00	4,25
12,5	1,75	1,75	2,50	2,25
25	1,50	2,00	1,50	2,25
50	0,50	1,00	0,50	1,00
Testemunha não tratada	3,50		3,50	

Na TABELA 12, observa-se que ambas as testemunhas com solvente (acetona e metanol), apresentaram o mesmo número de grãos perfurados, indicando que não existe diferença entre este solventes, sob o ponto de vista da sua ação sobre os insetos.

Constata-se que a porcentagem de grãos perfurados nos grãos tratados com solvente foi significativamente maior (t ; $P < 0,05$) do que nos grãos sem tratamento, ou seja, os solventes aparentemente facilitaram a perfuração dos grãos pelos insetos adultos.

Pela FIGURA 14, verifica-se que a porcentagem de grãos perfurados diminuiu sensivelmente com o aumento da concentração, evidenciando a ação fagoinibidora dos extratos de *F. nigrum* sobre estes insetos.

O aumento na porcentagem de grãos perfurados entre a 1ª e a 2ª avaliação foi maior nas concentrações mais baixas, possivelmente devido à reduzida mortalidade provocada por estas concentrações.

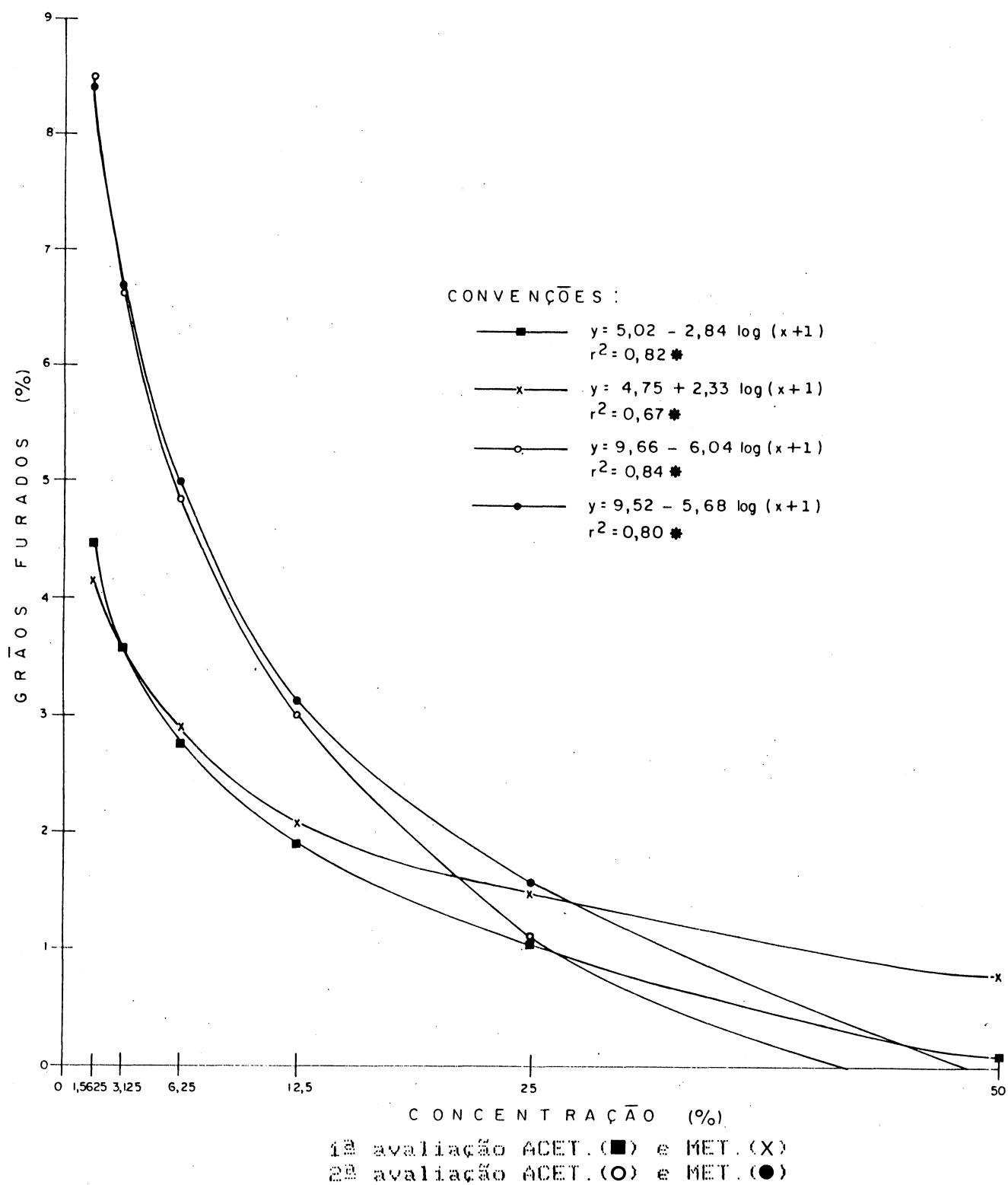


FIGURA 14. Porcentagem de grãos perfurados em função da concentração dos extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Outros dois fatores utilizados para avaliar a ação fagoinibidora dos extratos de *P. nigrum* sobre *S. zeamais* foram o tipo e a distribuição das perfurações feitas pelos insetos.

As perfurações encontradas (FIGURA 15) foram separadas em dois grupos: perfurações de alimentação (perfurações que atravessavam o tegumento do grão, atingindo o endosperma; facilmente visíveis a olho nú); e perfurações de prova (perfurações superficiais, visíveis apenas sob lupa).

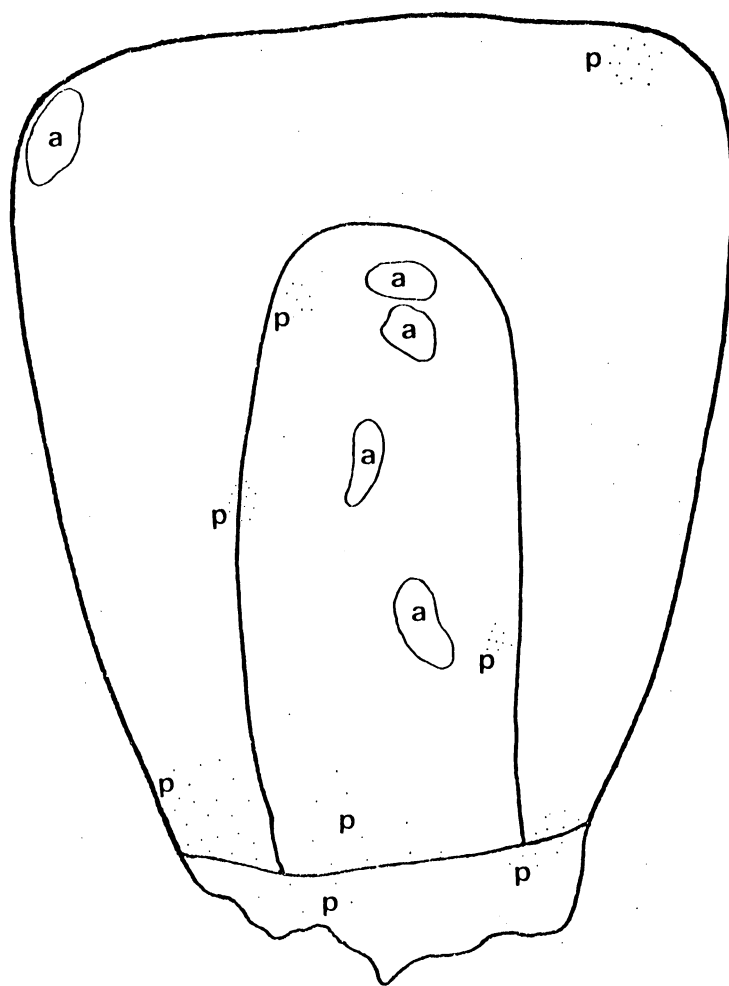


FIGURA 15. Tipo e distribuição das perfurações feitas por adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

(a) alimentação (p) prova

TABELA 13. Perfurações de alimentação e de prova (%) encontradas em grãos de milho tratados com extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*, dois dias após a infestados com adultos de *Sitophilus zeamais*.

Concen- tração	ACET.		MET.	
	Alimentação	Prova	Alimentação	Prova
0	100	0	93	7
1,5625	79	21	60	40
3,125	62	38	56	44
6,25	56	44	30	70
12,5	29	71	29	71
25	17	83	25	75
50	0	100	0	100

Observa-se que os extratos provocaram uma alteração significativa no comportamento alimentar dos insetos. Esta alteração caracterizou-se pela diminuição das perfurações de alimentação e conseqüente aumento das perfurações de prova, de acordo com o aumento da concentração dos extratos (TABELA 13, FIGURAS 16 e 17).

De acordo com Chapman (1974), as alterações provocadas por substâncias fagoinibidoras no comportamento alimentar dos insetos são complexas e bastante específicas.

Redfern (1983), diz que, de modo geral, o inseto prova tanto o alimento tratado com substância fagoinibidora como o não tratado. Entretanto, ao contactar a substância fagoinibidora, ele pode perder a capacidade de reconhecer o alimento como tal e ficar

vagando sobre ele, num contínuo processo de prova e rejeição. Isto explicaria a variação do tipo (prova/alimentação) e a distribuição das perfurações observada neste estudo.

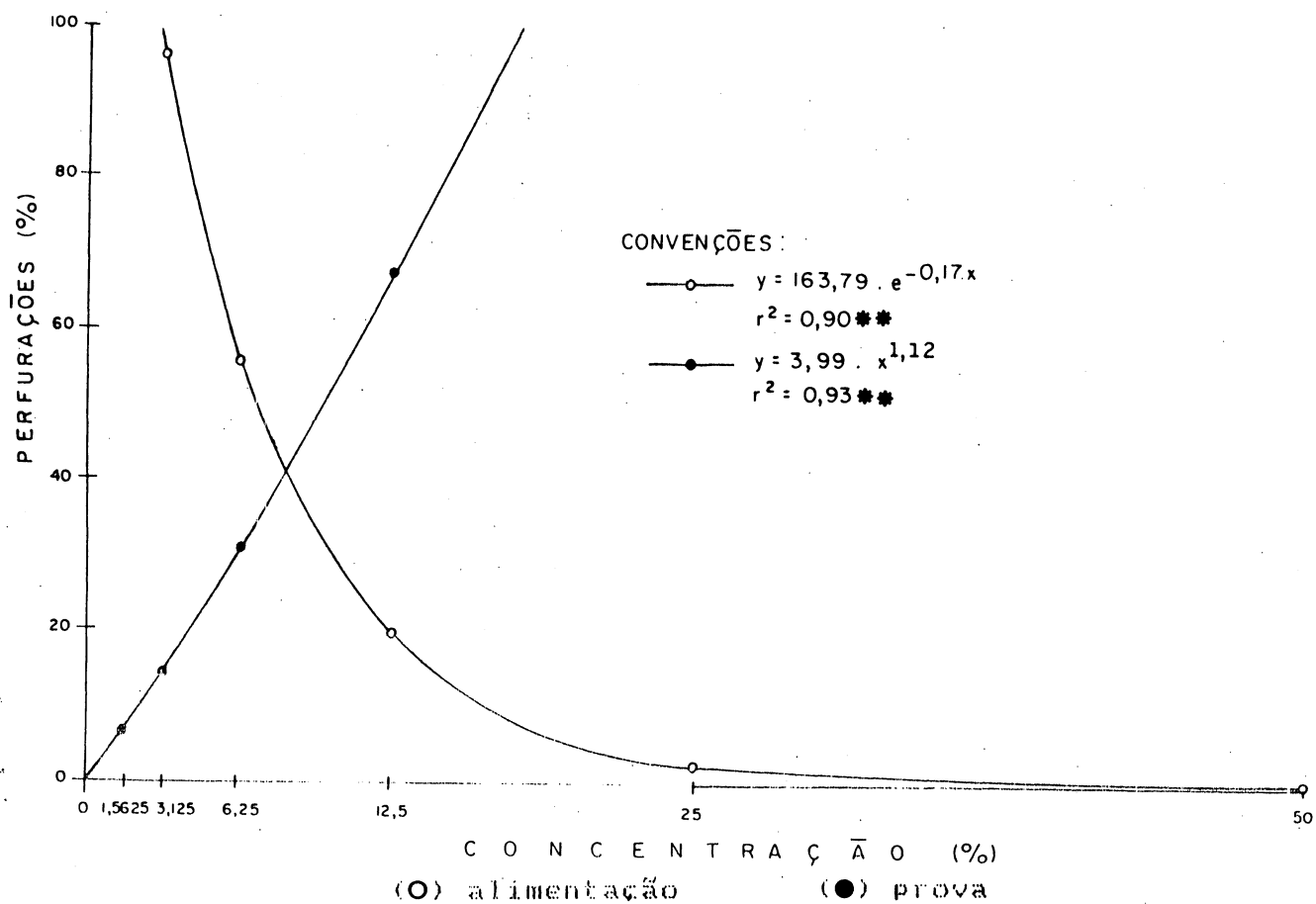


FIGURA 16. Porcentagem de perfurações de alimentação e prova em função da concentração de extrato acetônico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

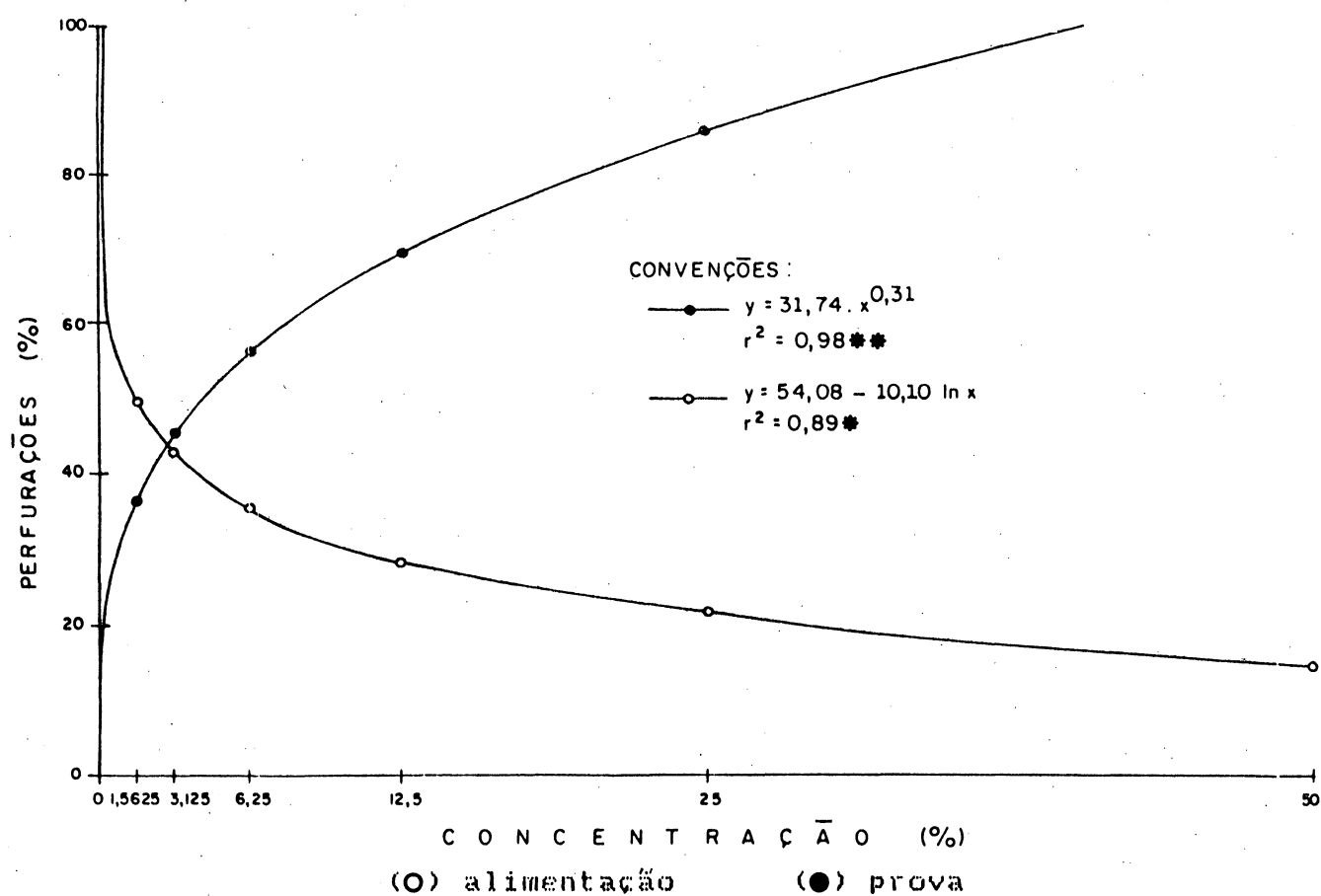


FIGURA 17. Porcentagem de perfurações de alimentação e prova em função da concentração de extrato metanólico de *Piper nigrum*

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4. Repelência

Os resultados dos ensaios de repelência encontram-se nas FIGURAS 18 a 21 e APÊNDICES XI, XII e XIII.

De acordo com estes resultados, o extrato acetônico de *P. nigrum* apresentou efeito repelente sobre adultos de *S. zeamais*, tanto no ensaio de dupla escolha como no de múltipla escolha.

No ensaio de dupla escolha (FIGURA 18), realizado com grãos tratados com acetona e grãos tratados com a concentração de 50% do extrato acetônico, apenas 3% dos insetos utilizados foram encontrados nos grãos tratados com extrato, enquanto 97% foram encontrados na testemunha com acetona, demonstrando claramente o efeito repelente do extrato de *P. nigrum* sobre os adultos de *S. zeamais*.

Comparando estes resultados com os obtidos com grãos tratados 11 meses antes da data do experimento (FIGURA 19), verifica-se que o extrato apresentou alta persistência do efeito repelente, uma vez que, mesmo após este período de armazenamento, permaneceu alta a diferença entre a porcentagem de insetos encontrados em grãos tratados com extrato (11%) e nos tratados com solvente (89%) .

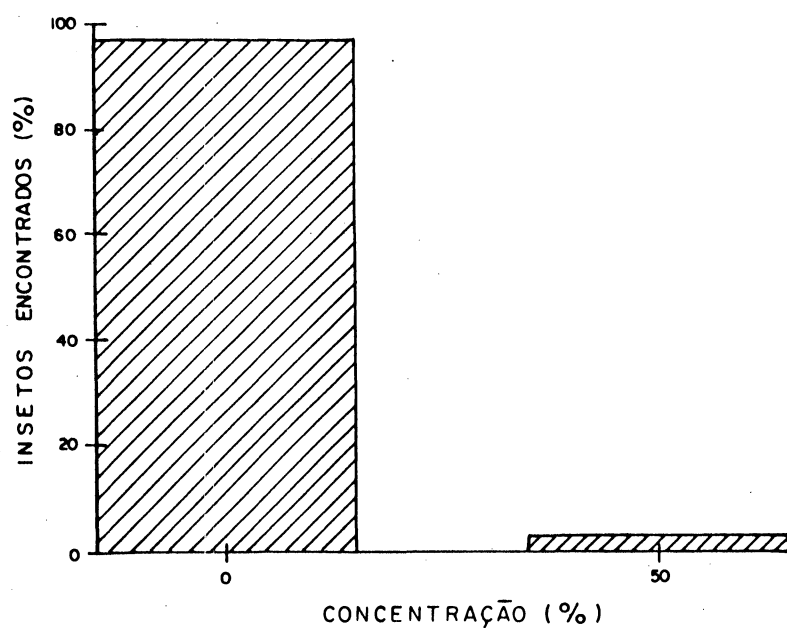


FIGURA 18. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* e em grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de dupla escolha.

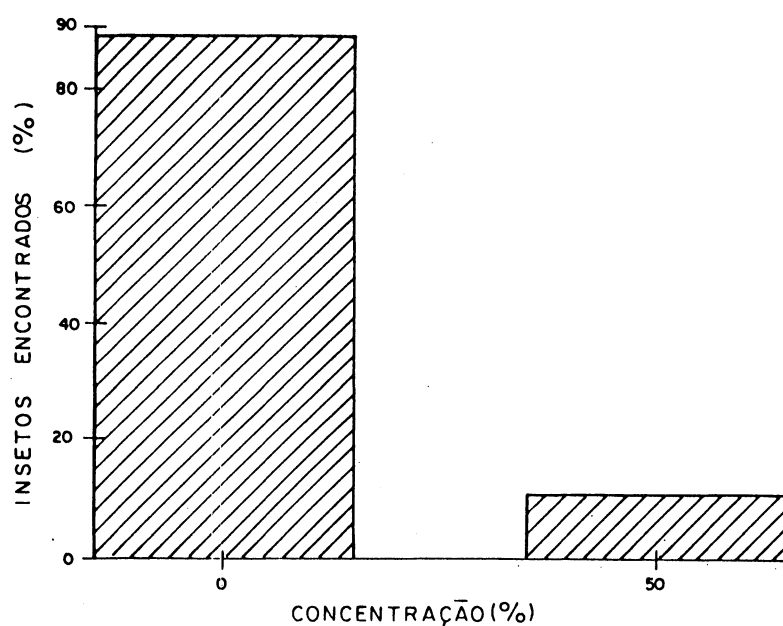


FIGURA 19. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extrato acetônico¹ de *Piper nigrum* e em grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de dupla escolha.

1. grãos tratados 11 meses antes do ensaio.

No ensaio de múltipla escolha, realizado com as concentrações de 25, 12,5 e 6,25% do extrato acetônico e com a testemunha (acetona) apenas 15,3% dos insetos liberados foram encontrados nos grãos tratados com extrato, enquanto 84,7% estavam na testemunha com acetona (FIGURA 20).



FIGURA 20. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* e em grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de múltipla escolha.

Na FIGURA 21, onde está representada a equação de regressão da porcentagem de insetos encontrados em função da concentração, fica evidenciado o crescimento da repelência de acordo com o aumento da concentração do extrato.

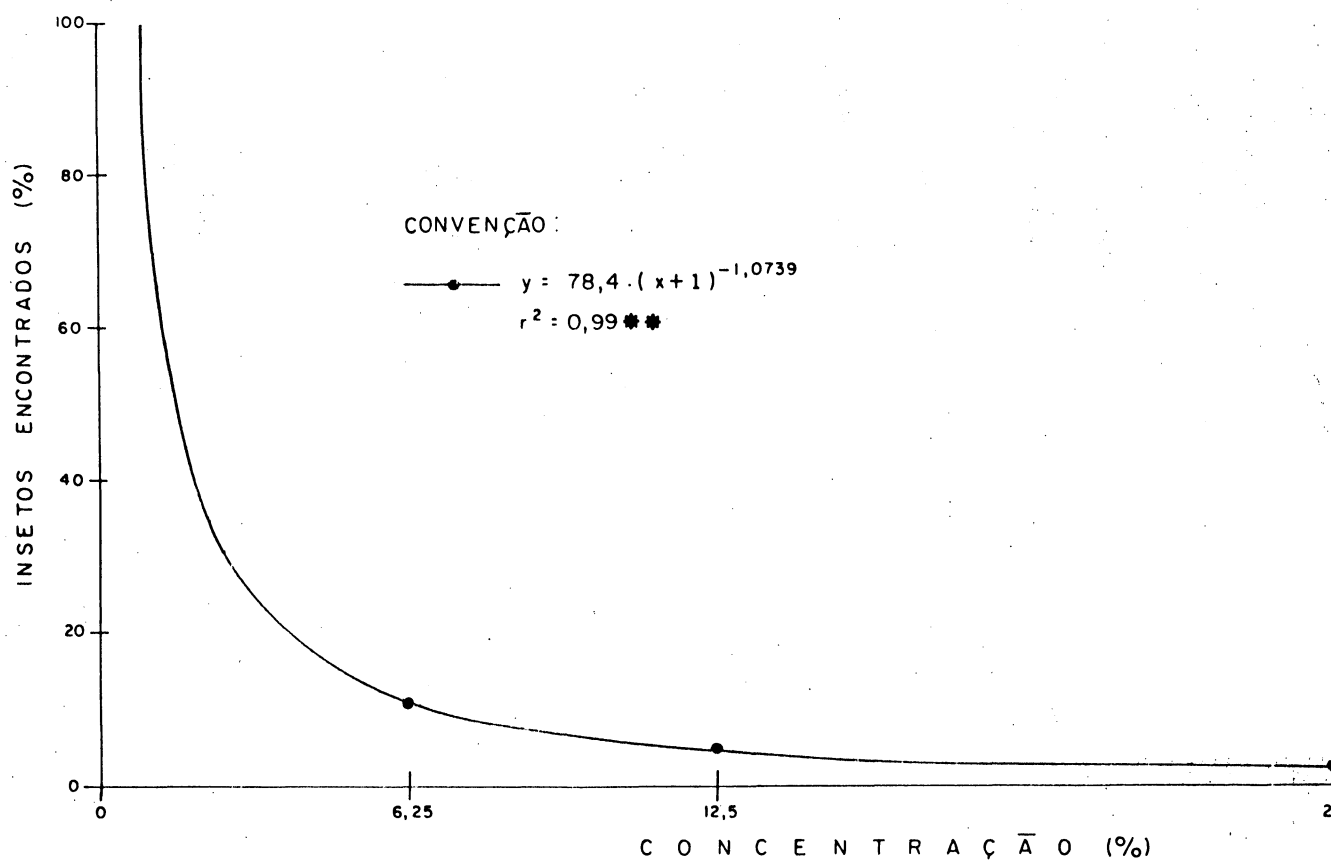


FIGURA 21. Porcentagem de adultos de *Sitophilus zeamais* presentes em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* em função da concentração, após 24 horas de exposição em ensaio de múltipla escolha.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

5. Ação sobre a progênie (F1) de indivíduos expostos a grãos tratados com extratos de *Piper nigrum*.

Os resultados do efeito dos extratos de *Piper nigrum* sobre a emergência de adultos de *Sitophilus zeamais* encontram-se representados na TABELA 14, FIGURAS 22 e 23 e APÊNDICES XIV e XV.

TABELA 14. Número de *Sitophilus zeamais* emergidos em grãos tratados com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

Concentração (%)							
Extrato	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
ACET.	489	418	174	92	15	0	0
MET.	496	362	256	144	9	9	0

Analisando a TABELA 14, verifica-se que o aumento da concentração dos extratos provocou uma grande redução da F1, de tal forma que nas concentrações mais elevadas a ação dos extratos impediu o aparecimento da F1, no período de tempo considerado.

Nas FIGURAS 22 e 23, referentes à emergência acumulada da F1 a cada 10 dias, para os extratos acetônico e metanólico, verifica-se que, em relação à testemunha com solvente, estes provocaram um nítido atraso nos picos de emergência da F1. Este atraso ocorreu, provavelmente, em função dos efeitos biológicos dos extratos, que interferem no comportamento dos adultos.

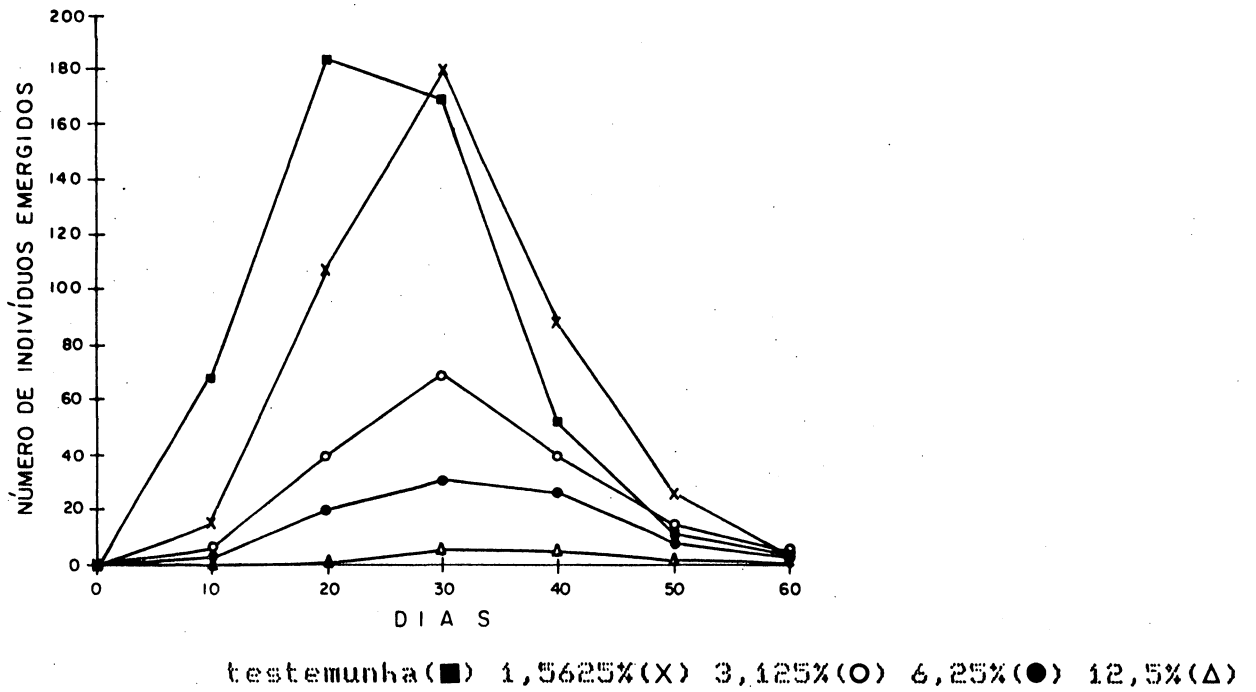


FIGURA 22. Emergência da F1 de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com o extrato acetônico de *Piper nigrum* e com solvente (acetona), em valores acumulados a cada dez dias.

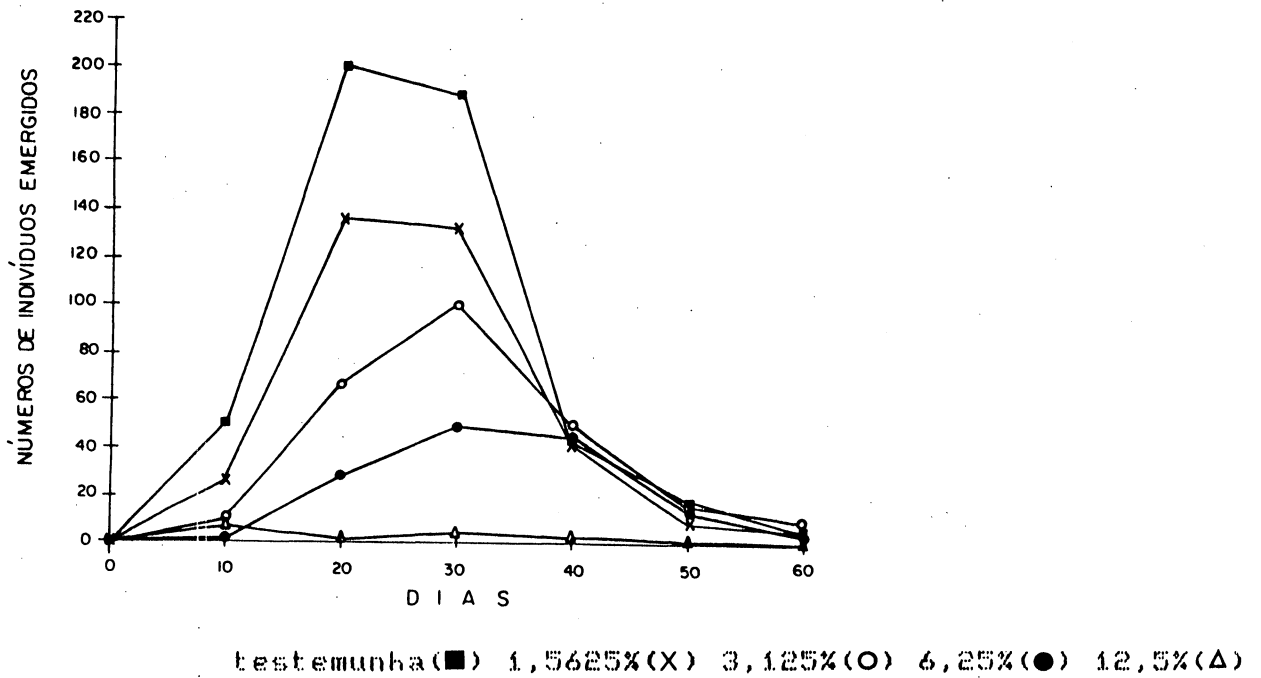


FIGURA 23. Emergência da F1 de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com o extrato metanólico de *Piper nigrum* e com o solvente (metanol), em valores acumulados a cada dez dias.

6. Proteção

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o conjunto de efeitos biológicos, entre eles toxicidade, fagoinibição e repelência, provocados pela ação dos extratos de *P. nigrum* sobre adultos de *S. zeamais*, pode criar barreiras para a alimentação e para a perfuração do grão para a realização da postura, as quais podem proteger os grãos de milho armazenado contra o ataque deste inseto. Este resultado concorda com os obtidos por Su (1977, 1978, 1984a e b) e Javier & Morallo-Rejesus (1986), que trabalharam com vários insetos-praga de grãos armazenados.

Esta proteção poderia ser atribuída inteiramente ao efeito tóxico do extrato que, ao intoxicar e/ou matar os casais iniciais, impediria a sua reprodução, entretanto, analisando-se a porcentagem de proteção paralelamente à mortalidade dos casais durante os 28 dias que estes permaneceram sobre os grãos (TABELA 15; APÊNDICES XVII e XVIII), constata-se que, mesmo naquelas concentrações onde a mortalidade dos casais foi muito pequena (ou nula), ocorreu alguma proteção devido à ação do extrato.

Ainda na mesma TABELA, verifica-se que na concentração de 1.5625% do extrato acetônico não ocorreu mortalidade e, no entanto, a proteção foi de 14% em relação à testemunha; na concentração de 3.125% de extrato metanólico, a mortalidade foi de apenas 18,2%, mas a proteção chegou a 49%.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Su & Sondengan (1980), que verificaram que a toxicidade tópica de várias amidas alcaloidais presentes em *P. guineense* e em *P. nigrum*, para adultos de *S. orizae*, entre outros, foi de moderada a baixa.

Entretanto, os grãos de trigo tratados com cada uma das substâncias na concentração de 3000ppm (equivalente a 3%) foram protegidos satisfatoriamente contra infestação de *S. orizae*, demonstrando que não foi só o efeito tóxico que atuou na proteção dos grãos. Este fato explicaria a alta porcentagem de proteção obtida com as concentrações de 25 e 50% do extrato acetônico e 50% do extrato metanólico.

TABELA 15. Mortalidade(%) dos casais de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum* e Proteção¹ (%) obtida pela redução da F1.

Concentração (%)	Mortalidade (%) dos casais		Proteção ¹ (%)	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
0	0	0	0	0
1,5625	0	4,0	14,0	27,0
3,125	44,4	18,2	64,4	48,7
6,25	65,4	47,9	81,2	70,9
12,5	88,8	88,8	97,0	98,2
25	92,6	92,8	100,0	98,2
50	98,8	95,8	100,0	100,0

$$1. \text{Proteção}(\%) = \frac{\text{Total F1 Testemunha} - \text{Total F1 tratamento}}{\text{Total F1 Testemunha}} \times 100$$

Javier & Morallo-Rejesus(1986) verificaram uma significativa redução na F1 de *S.zeamais* em grãos tratados com

extrato de *P. nigrum* e constataram que esta redução indica que o extrato afeta o desenvolvimento das formas imaturas deste inseto. Entretanto, a redução da F1 por si só não significa que o desenvolvimento das formas imaturas tenha sido afetado, mas somente que as alterações provocadas pelos extratos causaram uma diminuição da F1. Estas alterações incluem os efeitos biológicos já discutidos anteriormente; a ação dos extratos sobre os ovos e, ainda, uma possível ação direta sobre as larvas no interior do grão.

No presente estudo, conforme resultados previamente apresentados, observou-se que os extratos de *P. nigrum* possuem efeito fagoinibidor (impede o inseto de se alimentar do substrato tratado) e repelente (provoca movimento em direção contrária ao substrato tratado) sobre *S. zeamais*, que provocam alterações na biologia deste inseto.

O extrato acetônico apresentou um efeito mais acentuado que o metanólico na proteção dos grãos, pois apresentou uma menor quantidade de insetos emergidos na maioria das concentrações em relação à testemunha com solvente. Além disso, enquanto foi obtida proteção 100% já na concentração de 25% do extrato acetônico, para o extrato metanólico esta porcentagem de proteção ocorreu apenas na concentração 50% (TABELA 15). As equações de regressão para a porcentagem de proteção obtida em função da concentração dos extratos (FIGURA 24), também evidenciam a maior eficiência do extrato acetônico.

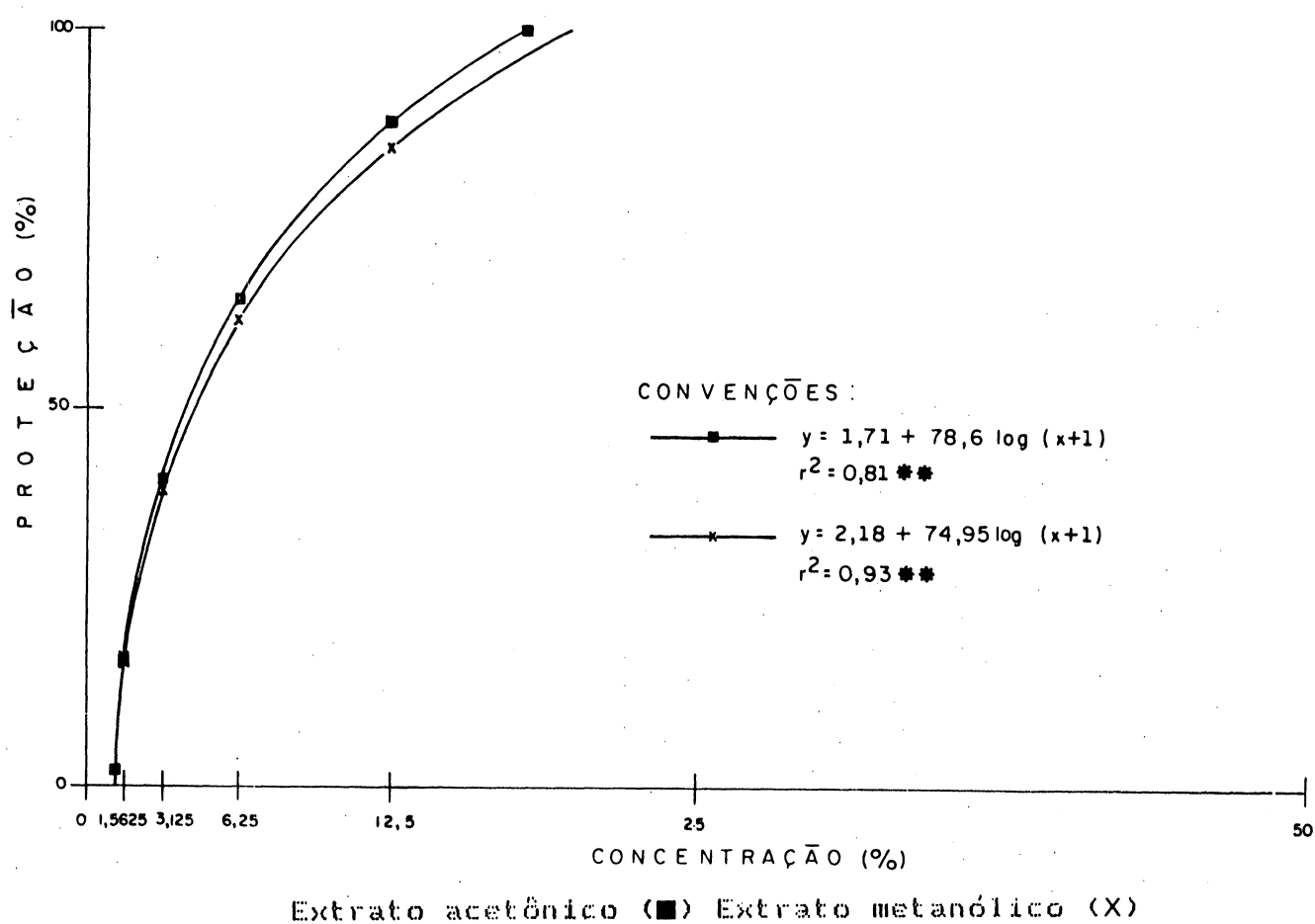


FIGURA 24. Proteção em função das concentrações dos extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum*.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Conclusões

- os extratos acetônico e metanólico de frutos secos de *Piper nigrum* foram tóxicos para adultos de *Sitophilus zeamais*;

- o extrato acetônico foi, em média, mais tóxico do que o extrato metanólico;

- a conservação dos extratos em congelador ($T=0^{\circ}\text{C}$) pelo período de 1 ano, não provocou alteração significativa no seu efeito tóxico;

- o efeito residual do extrato acetônico foi significativamente superior ao do extrato metanólico;

- os extratos apresentaram efeito fagoinibidor para adultos de *Sitophilus zeamais*;

- grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* foram repelentes para adultos de *Sitophilus zeamais*;

- a exposição de adultos de *Sitophilus zeamais* a grãos de milho tratados com extratos de *Piper nigrum* provocou uma significativa redução da progênie (F1) destes indivíduos;

- a proteção oferecida pelas 3 concentrações (12,5, 25 e 50%) mais elevadas dos extratos de *Piper nigrum* ofereceram

proteção superior a 95% contra *Sitophilus zeamais*;

- o extrato acetônico foi mais eficaz na proteção dos grãos de milho contra *Sitophilus zeamais*, a qual alcançou 100% já na dosagem de 25%;

- a proteção pode ser atribuída a um conjunto de efeitos biológicos, que incluem a ação tóxica, de repelência e de fagoinibição.

Resumo

A determinação do efeito tóxico de extratos acetônico e metanólico de *Piper nigrum* sobre *Sitophilus zeamais* foi feita através da exposição de adultos do inseto a grãos de milho tratados, durante 28 dias. A maior parcela da mortalidade ocorreu, em geral, até o 10º dia após a infestação. A toxicidade média do extrato acetônico foi significativamente maior ($P < 0,05$) que a do extrato metanólico.

Extratos que foram armazenados durante 1 ano ($T=0^{\circ}\text{C}$) não apresentaram diferença significativa na toxicidade média, em comparação aos extratos frescos.

Ensaio biológico para a determinação do efeito residual das duas dosagens mais elevadas (25 e 50%) dos extratos de *P. nigrum*, foram realizados 15, 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos extratos sobre os grãos de milho. Ocorreu uma diminuição do efeito tóxico proporcionalmente ao aumento do intervalo de tempo entre tratamento e infestação. O extrato acetônico apresentou maior persistência do efeito tóxico no período de 90 dias, em relação ao extrato metanólico.

A ação fagoinibidora dos extratos foi avaliada através da comparação da quantidade, tipo e distribuição das perfurações em grãos tratados, observadas 2 e 4 dias após a infestação. Esta ação foi caracterizada pela diminuição da porcentagem de grãos

perfurados de acordo com o aumento da dosagem, bem como pela alteração do tipo e distribuição destas perfurações.

A concentração de 50% do extrato acetônico apresentou ótima repelência, após 24 horas de exposição em ensaio de dupla escolha. Apenas 3% dos insetos utilizados no ensaio foram encontrados nos grãos tratados com o extrato, enquanto 97% foram encontrados na testemunha tratada com solvente. A mesma concentração ainda apresentou boa repelência 11 meses após o tratamento dos grãos, sendo que 12,3% dos insetos utilizados foram encontrados nos grãos tratados com extrato. No ensaio de múltipla escolha, apenas 15,3% dos insetos liberados foram encontrados em grãos tratados com as concentrações de 25, 12,5 e 6,25 % do extrato acetônico. Neste ensaio evidenciou-se o aumento da repelência de acordo com o aumento da concentração.

A proteção foi avaliada pela comparação da F1 de *S. zeamais* nos grãos tratados com extratos e nos grãos tratados com solvente. Verificou-se que a proteção diminuiu com a diminuição da concentração dos extratos. O extrato acetônico ofereceu 100% de proteção na concentração de 25%, enquanto o extrato metanólico ofereceu 100% de proteção apenas na concentração 50%. Esta proteção foi atribuída a um conjunto dos efeitos biológicos dos extratos sobre os insetos, incluindo toxicidade, fagoinibição e repelência.

Summary

The toxicity of *Piper nigrum* extracts to *Sitophilus zeamais* was determined by the evaluation of adult mortality within 28 dias of exposure to treated corn grain. Most of the mortality occurred 10 days after infestation. The average toxicity of the acetone extract was significantly higher ($P<0,05$) than that of the methanol extract.

Acetone and methanol extracts stored ($T=0^{\circ}\text{C}$) during one year showed no significant reduction ($P<0,05$) of the average toxicity, comparing with fresh extracts.

Biological essays to determine the residual effect of the two largest concentrations (25 and 50%) of the extracts took place 15, 30, 60 and 90 days after the treatment of the grains. The residual effect was significantly reduced ($P<0,05$) with the increase of the period between treatment and infestation. The toxic effect of the acetone extract was higher than that of the methanol extract, after 90 days.

The antifeeding action of the extracts was evaluated by the comparison of the quantity, type and distribution of punctures in treated corn grains, observed 2 and 4 days after infestation. The quantity of punctured grains decreased as the concentration increased. The type and distribution of the punctures showed a significant alteration with the increase of the concentration of the extracts.

The acetone extract of *Piper nigrum*, at the concentration of 50%, was very effective in repelling adult

Sitophilus zeamais when evaluated by a double choice essay. Only 3% of the insects used were found in the extract-treated grains, after a 24-hours period of exposure. The same concentration was still very effective after 11 months of the application, with 12,3% of the insects used being present in extract-treated grains. The acetone extract at the concentrations of 25, 12,5 and 6,25% showed good repellency when evaluated by a multiple choice essay, with 15,3% of the insects used being present in extract-treated grains. The repellency decreased as the concentration of the treatment decreased.

The protection of corn grain with the two extracts of *P.nigrum* against infestation of *S.zeamais* was evaluated by comparing the number of F1 progenie emerging from extracts-treated grains with the number emerging from solvent-treated grains. The protection decreased as the concentration decreased. The acetone extract provided 100% protection at 25% concentration, while the methanol extract provided 100% protection only at 50% concentration. This protection may be ascribed to an association of the biological effects of the extracts, including toxicity, antifeeding and repellent actions.

Referências Bibliográficas

- Ahmed, S. & M. Grainge. 1986. Potential of the neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development. *Econ. Bot.*, 40(2): 201-209.
- Chapman, R.F. 1974. The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects: a review. *Bull. Entomol. Res.*, 64: 339-363.
- Chatterjee, A & C.P. Dutta. 1966. Alkaloids of *Piper longum* L. Structure and synthesis of piperlongumine and piperlonguminine. *Tetrahedron*, 23: 1769-1781.
- Freeborn, S.B. & F.H. Wymore. 1929. Attempts to protect sweet corn from infestations of the corn ear worm, *Heliothis obsoleta* (Fabr.). *J. Econ. Entomol.*, 23(4): 666-671.
- Grewe, R.; W. Freist; H. Neumann & S. Kersten. 1970. Über die Inhaltsstoffe des schwarzen Pfeffers. *Chem. Ber.*, 103: 3752-3770.
- Gupta, O.P.; S.C. Gupta; K.L. Dhar & C.K. Atal. 1977. A new amide from *Piper officinarum*. *Phytochemistry*, 16: 1436-1437.
- Hartzell, A. 1944. Further tests on plant products for insecticidal properties. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 13(5): 243-252.
- Hartzell, A. & F. Wilcoxon. 1941. A survey of plant products for insecticidal properties. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 12(2): 127-141.
- Harvill, E.K.; A. Hartzell & J.M. Arthur. 1943. Toxicity of piperine solutions to houseflies. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 13: 87-92.
- Jacobson, M. 1953. Pellitorine isomers II. The synthesis of N-isobutyl-trans-2,trans-4-deadienamide. *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 2584-2586.
- Javier, P.A. & B. Morallo-Rejesus. 1986. Insecticidal activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) extracts. *Phillipp. Entomol.*, 6(5): 517-525.

- Joshi, B.S.; N. Viswanathan; D.H. Gawad & W. von Philipsborn. 1975. Piperaceae alkaloids: Part I. Structure of piperstachine; C- and H-NMR studies. *Helv. Chim. Acta* 58: 1551-1559.
- Lathrop, F.H. & L.G. Keirstead. 1946. Black pepper to control the bean weevil. *J. Econ. Entomol.*, 39: 534.
- Levinson, H.Z. 1976. The defensive role of alkaloids in insects and plants. *Experientia*, 32:408.
- Loder, J.W.; A. Moorhouse & G.B. Russell. 1966. Tumour inhibitory plants. Amides of *Piper novae-hollandiae* (Piperaceae). *Aust. J.Chem.*, 22: 1531-1538.
- Luca, Y. de . 1982. Produits d'origine végétale opposables aux bruchides (Col.). (Attractifs, antiappétants, dissuadants, repulsifs, létaux). *Frustula Entomol.* 2: 19-29.
- McIndoo, N.E. & A.F. Sievers. 1924. Plants tested for or reported to possess insecticidal properties. USDA Department Bulletin 1201.
- Miller, A.; R. Philips & L.D.Cline. 1969. Rearing manual for stored-product insects used by USDA Stored-Product Insects Research and Development, Savannah, GA., 36p.
- Miyakado, M. & H. Yoshioka. 1979. The Piperaceae amides II: Synthesis of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.*, 43(11): 2413-2415.
- Miyakado, M.; I. Nakaiama & H. Yoshioka. 1980. Insecticidal joint action of pipericide and co-occurring compounds isolated from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.*, 44(7): 1601-1703.
- Miyakado, M.; I. Nakayama; N. Ohno & H. Yoshioka. 1983. Structure, chemistry and actions of the Piperaceae amides: new insecticidal constituents isolated from the pepper plant, p.363-382. In: Natural Products for innovative pest management D.L. Whitehead & W.S. Bowers (eds.). Pergamon Press Ltd., London, England.
- Miyakado, M.; I. Nakaiama; H. Yoshioka & N. Nakatani. 1979. The Piperaceae amides I: structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.*, 43(7): 1609-1611.
- Nakatani, N. & R. Inatani. 1981. Isobutyl amides from pepper (*Piper nigrum* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 45(6): 1473-1476.

- Normant, H. & C. Feugeas. 1964. Synthèse totale de la pipérine. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 258: 2846-2848.
- Redfern, R.E. 1981. Insect bioassays, p. 479-485. In: *Handbook of Natural Pesticides: Methods, vol. I Theory, practice and detection*. N.B. Mandava (ed.). CRC Series in Agriculture. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Scott, W. & G.H. McKibben. 1978. Toxicity of black pepper extract to boll weevil. *J. Econ. Entomol.*, 71(2): 343-344.
- Sighamony, S.; I. Annes; T. Chandrakala & Z. Osmani. 1986. Efficacy of certain plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.). *J. stored Prod. Res.*, 22(1): 21-23.
- Singh, N. & S.S. Krishna. 1980. Effect of some common oilseeds and spices serving as adult food on the reproductive potential of *Tribolium castaneum* (Hbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae) *Entomon* 5(3): 161-162.
- Sondengam, B.L., S.F. Kimbu & J.D. Connolly. 1977. A new piperine-type amide from *Piper guineense*. *Phytochemistry*, 16: 1121-1122.
- Su, H.C.F. 1977. Insecticidal properties of black pepper to rice weevils and cowpea weevils. *J. Econ. Entomol.*, 70(1): 18-21.
- Su, H.C.F. 1978. Laboratory study on toxic effect of black pepper varieties to three species of stored-product insects. *J. Ga. Entomol. Soc.*, 13(3): 269-274.
- Su, H.C.F. 1984a. Evaluation of black pepper as a protectant of wheat in storage against rice weevils. *J. Ga. Entomol. Soc.*, 19(1): 45-48.
- Su, H.C.F. 1984b. Comparative toxicity of three peppercorn extracts to four species of stored-product insects under laboratory conditions. *J. Ga. Entomol. Soc.*, 19(2): 190-199.
- Su, H.C.F. & B.L. Sondengam. 1980. Laboratory evaluation of toxicity of two alkaloidal amides of *Piper guineense* to four species of stored-product insects. *J. Ga. Entomol. Soc.*, 15(1): 47-52.
- Synerholm, M.E.; A. Hartzell & J.M. Arthur. 1945. Derivatives of piperic acid and their toxicity toward houseflies. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 13: 433-442.

Takahashi, S.; M. Kurabayashi; A. Ogiso & H. Mishima. 1969.
Structure of futoamide, a constituent of *Piper fufokadzura*.
Chem. Pharm. Bull. Japan, 17: 1225-1228.

Apêndices

APÊNDICE I. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos tratados de milho com extrato acetônico de *Piper nigrum*.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1	3
4	0	0	0	0	0	4	11
5	0	1	0	0	4	6	10
6	0	1	2	0	4	13	14
7	0	0	1	1	9	8	10
8	0	0	2	3	5	4	4
9	0	0	3	1	6	3	4
10	0	0	0	0	0	3	1
11	0	3	2	0	5	1	1
12	0	0	3	0	1	0	0
13	0	0	0	0	1	1	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	1	0	0	1	0
16	0	0	0	0	1	0	0
17	0	0	0	1	1	0	0
18	0	0	0	2	3	0	0
19	0	0	0	0	1	0	0
20	0	0	0	2	0	1	0
21	0	0	0	1	1	1	0
22	0	0	1	3	1	1	0
23	0	0	2	1	2	0	0
24	0	0	0	0	1	1	0
25	0	0	0	4	0	0	0
26	0	0	0	0	3	0	0
27	0	0	1	0	1	0	0
28	3	0	0	3	0	0	1

1. Somatória de 4 repetições.

APÊNDICE II. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum*.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	1	0	0
4	0	0	0	0	1	0	3
5	0	0	1	0	2	7	8
6	1	1	0	2	2	7	17
7	0	0	0	4	2	8	6
8	0	0	0	1	3	10	7
9	0	0	0	4	3	1	4
10	0	0	0	0	1	2	2
11	0	0	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	1	1
14	0	0	0	1	2	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	2	0	0
17	0	0	0	0	0	2	0
18	0	0	0	0	1	1	0
19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	2	2	0
21	0	0	0	1	0	4	0
22	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	4	1	0
24	0	0	0	0	1	2	0
25	0	0	0	1	0	1	0
26	0	0	0	1	5	1	0
27	0	0	0	2	3	1	2
28	0	0	1	1	0	1	1

1. Somatória de 4 repetições.

APÊNDICE III. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* que foi armazenado (T=0°C) por 1 ano.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0	0
3	0	0	0	1	0	0	0
4	0	1	0	1	1	0	0
5	0	1	0	0	1	3	4
6	0	0	0	2	6	8	6
7	0	2	6	1	1	4	11
8	0	1	2	1	4	4	6
9	0	0	0	1	0	2	4
10	0	2	0	1	0	4	0
11	0	0	0	1	0	0	0
12	0	0	0	0	1	4	2
13	0	0	0	1	0	3	4
14	0	0	0	2	0	2	3
15	0	0	0	1	2	4	1
16	0	0	0	1	0	1	1
17	0	0	1	4	1	0	1
18	0	0	0	0	1	4	1
19	0	0	0	2	1	3	0
20	0	0	0	1	0	3	0
21	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	3	2	1	1
23	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	3	1	3
25	0	0	0	0	1	0	1
26	0	0	0	0	2	1	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	3	1	0	4

1. Somatória de 4 repetições.

APÊNDICE IV. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum* que foi armazenado (T=0°C) por 1 ano.

Dias após infestação	Concentração (%)						
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	1	2
5	0	0	1	0	3	3	10
6	0	0	0	0	3	2	6
7	0	0	0	0	1	2	10
8	0	0	0	0	1	1	8
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	4	4
11	0	0	0	0	1	5	1
12	0	0	0	1	2	6	2
13	0	0	0	0	3	4	2
14	0	0	0	0	3	3	3
15	0	0	0	0	4	3	2
16	0	0	0	0	1	3	0
17	0	1	0	0	2	2	2
18	0	0	0	0	1	2	0
19	0	0	1	1	0	2	0
20	0	0	0	0	4	4	0
21	0	0	0	0	0	1	0
22	0	0	0	3	3	2	3
23	0	0	0	0	1	1	0
24	0	0	0	1	1	0	0
25	0	0	0	0	0	1	0
26	0	0	0	0	0	0	2
27	0	0	0	0	1	0	0
28	0	0	0	1	0	2	0

1. Somatória de 4 repetições.

APÊNDICE V. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos infestados 15 dias após o tratamento com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

Dias	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	2	2
4	8	3	9	7
5	9	4	20	12
6	24	10	28	17
7	6	21	11	17
8	11	8	5	9
9	7	2	7	3
10	5	3	5	0
11	4	0	0	1
12	2	4	0	0
13	2	1	0	1
14	0	1	0	0
15	0	2	0	2
16	0	1	0	0
17	0	1	1	1
18	0	1	0	0
19	0	1	0	0
20	1	1	0	0
21	0	3	0	3
22	1	2	0	1
23	0	4	0	2
24	2	3	0	1
25	0	1	0	0
26	1	0	0	2
27	0	1	0	1
28	0	1	0	0

1. Somatória de 9 repetições

APÊNDICE VI. Mortalidade¹ observada em grãos infestados com adultos de *Sitophilus zeamais* 30 dias após o tratamento com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*

Dias	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
1	0	0	0	0
2	0	0	0	2
3	1	1	3	3
4	3	6	13	8
5	17	10	21	8
6	14	9	23	17
7	11	14	14	12
8	4	12	5	11
9	7	4	3	8
10	3	6	1	4
11	1	5	1	6
12	0	2	0	0
13	1	2	1	2
14	0	2	1	1
15	0	0	0	0
16	0	1	0	0
17	0	1	1	1
18	4	0	1	0
19	2	3	0	1
20	1	0	1	0
21	1	3	0	0
22	1	0	0	0
23	1	0	0	0
24	3	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	2	0	1
28	1	1	0	0

1. Somatória de 6 repetições.

APÊNDICE VII. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos infestados 60 dias após o tratamento com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

Dias	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	1	2	1
4	1	6	6	3
5	9	4	1	18
6	5	11	14	17
7	5	12	16	13
8	12	6	7	7
9	9	3	11	12
10	3	2	3	4
11	1	1	3	1
12	8	2	5	0
13	2	0	1	0
14	0	4	1	0
15	0	0	0	0
16	0	1	1	0
17	3	3	2	0
18	3	1	1	0
19	2	2	1	1
20	1	1	1	0
21	2	6	6	4
22	4	1	2	0
23	1	1	1	0
24	1	4	1	3
25	1	1	0	0
26	0	0	0	1
27	0	2	1	0
28	2	4	0	1

1. Somatória de 6 repetições.

APÊNDICE VIII. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos infestados 90 dias após o tratamento com extratos acetônico (ACET.) e metanólico (MET.) de *Piper nigrum*

Dias	Concentração (%)			
	25		50	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	0	2	0	1
4	2	1	8	4
5	5	8	20	8
6	11	19	12	21
7	8	11	14	11
8	5	7	9	10
9	8	1	5	4
10	3	3	3	4
11	0	1	1	0
12	0	1	1	4
13	2	2	2	0
14	2	0	0	0
15	1	1	1	1
16	5	1	1	1
17	3	0	1	1
18	2	0	0	0
19	1	2	0	2
20	1	0	0	0
21	2	5	2	7
22	0	0	1	1
23	3	0	0	1
24	2	1	2	1
25	1	1	1	0
26	2	0	0	0
27	1	2	0	0
28	2	0	2	0

1. Somatória de 6 repetições.

APÊNDICE IX. Quantidade de grãos perfurados encontrados 2 e 4 dias após a infestação com *Sitophilus zeamais*.

Concentração (%)	2 dias		4 dias	
	ACET.	MET.	ACET.	MET.
0	14	14	49	49
1.5625	14	10	22	22
3.125	8	9	17	17
6.125	9	13	16	17
12.5	7	7	10	9
25	6	8	7	9
50	2	4	2	4

APÊNDICE X. Perfurações de alimentação e prova encontradas em grãos de milho tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* e infestados com adultos de *Sitophilus zeamais*.

Concentração (%)	2 dias		4 dias	
	Alimentação	Prova	Alimentação	Prova
0	14	0	49	0
1.5625	11	3	22	0
3.125	5	3	12	5
6.125	5	4	10	6
12.5	2	5	10	0
25	1	5	1	6
50	0	2	0	2

APÊNDICE XI. Perfurações de alimentação e prova encontradas em grãos de milho tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum* e infestados com adultos de *Sitophilus zeamais*.

Concentração (%)	2 dias		4 dias	
	Alimentação	Prova	Alimentação	Prova
0	13	1	49	0
1.5625	6	4	22	0
3.125	5	4	12	5
6.125	4	9	12	5
12.5	2	5	9	0
25	2	6	2	7
50	0	4	0	4

APÊNDICE XII. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* e grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de dupla escolha.

Concentração (%)	Repetição							
	A	B	C	D	E	F	G	H
0	70	73	75	68	74	72	75	75
50	5	2	0	7	1	3	0	0

APÊNDICE XIII. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados¹ com extrato acetônico de *Piper nigrum* e grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de dupla escolha.

Concentração (%)	Repetição							
	A	B	C	D	E	F	G	H
0	63	73	67	66	67	68	64	66
50	12	2	8	9	8	7	11	9

1. 11 meses antes do ensaio.

APÊNDICE XIV. Distribuição de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum* e grãos tratados com solvente, após 24 horas de exposição em ensaio de múltipla escolha.

Repetição	Concentração (%)			
	0	6,25	12,5	25
1	51	9	4	1
2	57	6	1	1
3	60	2	2	1
4	56	4	3	2
5	55	6	2	2
6	60	4	0	1
7	61	2	1	1
8	58	3	3	1
9	50	13	1	1
10	47	10	1	7
11	50	5	10	0
12	56	3	2	4
13	55	3	5	2
14	52	7	3	3
15	60	1	1	3
16	53	8	4	0

APÊNDICE XV. Número de adultos¹ de *Sitophilus zeamais* emergidos em grãos tratados com extrato acetônico de *Piper nigrum*.

Dias após 1ª emer- gência	Concentração (%)							
	TEST.	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	0	2	0	0	0	0	0	0
2	1	3	0	0	0	0	0	0
3	1	4	0	0	0	0	0	0
4	4	6	0	0	0	0	0	0
5	2	4	1	0	1	0	0	0
6	7	6	0	0	0	0	0	0
7	6	12	3	0	0	0	0	0
8	2	11	2	0	0	0	0	0
9	4	10	4	2	2	0	0	0
10	6	10	5	4	0	0	0	0
11	13	18	7	2	3	0	0	0
12	13	23	10	2	0	0	0	0
13	14	19	10	5	1	0	0	0
14	9	12	13	3	2	0	0	0
15	14	17	4	6	2	0	0	0
16	15	15	11	5	3	0	0	0
17	11	16	9	4	1	0	0	0
18	19	18	16	1	5	0	0	0
19	17	24	12	4	0	1	0	0
20	24	22	16	8	3	0	0	0
21	18	20	17	9	2	0	0	0
22	16	14	24	9	0	1	0	0
23	18	26	16	10	4	0	0	0
24	20	20	23	10	6	2	0	0
25	10	17	12	6	3	1	0	0
26	13	21	14	4	3	3	0	0
27	5	15	23	6	3	0	0	0
28	11	9	19	3	2	0	0	0
29	11	13	20	7	6	0	0	0
30	8	14	12	5	2	1	0	0

APÊNDICE XV. continuação

31	7	10	13	10	0	1	0	0
32	7	9	19	6	3	2	0	0
33	6	7	9	9	1	0	0	0
34	5	2	18	2	4	0	0	0
35	4	4	13	3	4	0	0	0
36	2	5	3	4	3	0	0	0
37	2	8	6	2	5	0	0	0
38	2	3	1	3	0	0	0	0
39	3	3	3	0	1	0	0	0
40	0	1	3	1	6	0	0	0
41	0	3	4	2	1	0	0	0
42	0	2	6	2	0	0	0	0
43	1	2	2	1	0	0	0	0
44	0	2	4	1	0	0	0	0
45	3	0	5	1	2	1	0	0
46	0	1	2	2	2	0	0	0
47	2	1	0	1	2	1	0	0
48	0	0	2	0	0	0	0	0
49	0	1	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	4	1	0	0	0
51	1	1	0	0	1	0	0	0
52	2	1	0	2	1	0	0	0
53	1	0	1	0	0	0	0	0
54	1	0	0	1	0	0	0	0
55	0	0	0	0	1	0	0	0
56	2	0	1	0	0	0	0	0
57	0	0	0	1	0	0	0	0
58	0	1	0	1	0	1	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	1	0	0	0	0	0	0

1. Sonatória de 6 repetições.

APÊNDICE XVI. Número de adultos¹ de *Sitophilus zeamais* emergidos em grãos tratados com extrato metanólico de *Piper nigrum*.

Dias após 1 ^a emer- gência	TEST.	Concentração (%)						
		0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
1	1	0	2	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	1	0	0	0	0
5	1	4	4	0	0	0	0	0
6	0	2	2	0	1	0	0	0
7	5	11	1	0	0	0	0	0
8	7	11	4	5	0	0	0	0
9	2	15	10	0	1	0	0	0
10	8	7	2	5	0	0	0	0
11	7	10	6	5	0	0	0	0
12	11	13	16	9	2	0	0	0
13	7	20	9	8	1	0	0	0
14	13	27	8	3	4	0	0	0
15	13	18	19	8	6	4	0	0
16	20	26	20	4	0	0	1	0
17	12	10	9	2	3	0	4	0
18	11	23	18	6	6	0	2	0
19	22	22	13	8	4	0	0	0
20	20	32	19	15	3	0	0	0
21	20	18	12	10	4	0	2	0
22	25	25	16	5	8	0	0	0
23	17	24	23	9	1	0	0	0
24	20	27	12	15	7	0	0	0
25	12	17	12	15	6	0	0	0
26	19	28	14	10	8	0	0	0
27	20	20	9	6	8	0	0	0
28	10	10	14	16	3	0	0	0
29	14	17	7	8	1	1	0	0
30	6	3	14	8	4	0	0	0

APÊNDICE XVI. continuação.

31	4	1	7	3	3	0	0	0
32	4	10	4	8	2	0	0	0
33	9	7	4	4	5	0	0	0
34	4	6	4	5	8	0	0	0
35	7	2	3	11	7	0	0	0
36	3	5	3	2	3	2	0	0
37	3	1	2	1	1	0	0	0
38	6	3	3	8	11	2	0	0
39	4	5	9	6	2	0	0	0
40	4	2	4	3	4	1	0	0
41	0	2	3	3	2	1	0	0
42	4	1	1	1	1	0	0	0
43	3	0	1	2	5	0	0	0
44	1	2	1	1	1	0	0	0
45	1	0	2	1	1	0	0	0
46	1	3	1	2	0	2	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0
48	1	0	2	3	4	0	0	0
49	2	0	6	3	0	0	0	0
50	2	0	1	0	0	0	0	0
51	0	0	0	1	2	0	0	0
52	2	2	0	1	0	0	0	0
53	0	1	0	0	1	0	0	0
54	0	1	2	1	0	0	0	0
55	0	0	0	2	0	0	0	0
56	0	1	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0
59	1	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0

1. Somatória de 6 repetições.

APÊNDICE XVII. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extratos acetônicos (ACET.) de *Piper nigrum*.

Concentração (%)							
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
7	6	0	13	33	43	55	74
14	3	0	20	15	25	23	12
21	0	0	11	12	7	2	0
28	0	0	3	6	6	4	3

1. Somatória de 9 repetições.

APÊNDICE XVIII. Mortalidade¹ de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com extrato metanólico (MET.) de *Piper nigrum*.

Concentração (%)							
	0	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50
7	2	2	4	8	46	42	68
14	0	3	6	19	17	15	15
21	0	0	6	12	8	12	3
28	0	2	2	5	9	9	1

1. Somatória de 9 repetições.